ESTELA GALLUCCI LOPES

**Estudo de campo para avaliação da efetividade de vacinação e de uso de
coleiras impregnadas com inseticidas para o controle da leishmaniose
visceral canina**

São Paulo

2015

ESTELA GALLUCCI LOPES

Estudo de campo para avaliação da efetividade de vacinação e de uso de coleiras impregnadas com inseticidas para o controle da leishmaniose visceral canina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

De acordo:

Orientador

São Paulo

2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3179
FMVZ

Lopes, Estela Gallucci

Estudo de campo para avaliação da efetividade de vacinação e de uso de coleiras impregnadas com inseticidas para o controle da leishmaniose visceral canina / Estela Gallucci Lopes. -- 2015. 72 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Estudo de coorte. 3. Vacina. 4. Coleira impregnada com inseticida. 5. Métodos de controle. 6. Efetividade. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo de campo para avaliação da efetividade da vacinação e do uso de coleiras impregnadas com inseticidas para o controle de Leishmaniose Visceral Canina", protocolado sob o nº 2370/2011, utilizando número indeterminado de cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/5/2012.

We certify that the Research "Field study to evaluate the effectiveness of vaccination and collars impregnated with insecticides to control the Canine Visceral Leishmaniasis", protocol number 2370/2011, utilizing indeterminate number of dogs, under the responsibility Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 5/16/2012.

São Paulo, 18 de junho de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LOPES, Estela Gallucci

Título: Estudo de campo para avaliação da efetividade de vacinação e de uso de coleiras impregnadas com inseticidas para o controle da leishmaniose visceral canina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus pais
Gilberto e Cynthia, aos meus irmãos
Denis e Caio, ao meu noivo Daniel e
principalmente à minha avó Myrthes

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pela amizade, confiança e pela enorme paciência.

Agradeço aos professores do VPS Prof. Dr. Fernando Ferreira, Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias, Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari por terem me abrigado em seu departamento.

Ao Prof. Dr. Ricardo Duarte Silva e MSc. Carlos Alberto Geraldo Jr, amigos desde o início da minha trajetória científica.

Agradeço em especial à amiga Anaiá da Paixão Sevá companheira dessa incrível jornada.

Aos queridos amigos Sibebe Pinheiro, Vanessa Salgado, Thaísa Sandri, Daniela Chiebao, Samantha Valadas, Sheila Oliveira, Eveline Zuniga, Carol Torres, Juliana Martins, Julia Lima, Tatiana Jimenez, Juan David, Aline Gil, Camila Marinelli, Bruno Miotto, Herbert Soares.

Aos funcionários do VPS São Paulo, Danival, Virginia, Cristina, Renatinho e Pedrinho.

Aos funcionários e amigos da Vigilância Epidemiológica da cidade de Panorama, Danilo Diogo Fernandes, Micheli Santos, Claudia Faria, Aurora, Antonia, aos Médicos Veterinários MSc Danielly Bortolletto, Juliano Biffe e ao querido taxista Euver Matias.

Ao Dr. Roberto Hiramoto, e a todo o núcleo de parasitoses sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz, principalmente as técnicas de laboratório Elaine Barbosa de Oliveira e Cristina pela amizade e ajuda na realização dos testes diagnósticos.

A minha “família” VPS Pira, João Augusto Metzner, José Roberto DeVitto (Ni), Suellen, Sr. Antônio Santa Roza aos vizinhos Juliane e André por todo carinho, atenção, ajuda e apoio.

A Prof^a Dr^a Helena, Prof^a Lara e a técnica Julia Benasi do laboratório LMSASA da FZEA.

Aos meus pais, Gilberto e Cynthia, meus irmãos Denis e Caio por estarem sempre ao meu lado e torcendo por mim.

Ao meu noivo Daniel Golcman, pelo amor, carinho, compreensão e apoio durante esse longo período do doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo – FAPESP pelo auxílio a minha pesquisa e pelo suporte financeiro.

***If you can dream it, you can do it. Always remember
that this whole thing started with a dream and a
mouse.***

Walt Disney

RESUMO

LOPES, E. G. **Estudo de campo para avaliação da efetividade de vacinação e de uso de coleiras impregnadas com inseticidas para o controle da leishmaniose visceral canina.** [Field study to evaluate the effectiveness of vaccination and insecticides impregnated collars to control canine visceral leishmaniasis]. 2015. 72 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As leishmanioses e particularmente a leishmaniose visceral (LV) são doenças transmitidas por vetores artrópodes candidatas a experimentar uma grande expansão territorial em virtude de problemas relacionados ao aquecimento global. Este evento climático deverá causar grande impacto sobre a distribuição geográfica do artrópode transmissor no Brasil e no mundo. Com efeito, nos últimos 20 anos a situação epidemiológica da LV no Brasil vem se modificando de um padrão esporádico prevalente eminentemente em áreas rurais para uma condição de epidemias peri-urbanas que pode afetar todos os estratos sociais da população, tornando-se uma séria ameaça à saúde pública. As leishmanioses são consideradas até o momento doenças não preveníveis e seu padrão epidemiológico vêm se alterando de forma flagrante, o que demanda urgência para o desenvolvimento de novas ferramentas de controle e tratamento. Dentre as diversas questões levantadas sobre as demandas em pesquisa relacionadas ao controle desta enfermidade, destaca-se a importância de avanços em estudos de epidemiologia quantitativa e modelagem matemática que permitam prever efeitos de vacinações de populações empregando-se imunógenos com eficácia e/ou cobertura vacinal menor que 100%, o que parece ser uma realidade com as vacinas contra leishmanioses desenvolvidas até então pelos laboratórios no mundo todo. O sucesso de estratégias eficazes para o controle da LV depende do conhecimento de diversos parâmetros da dinâmica de infecção nas diferentes populações e espécies que atuam na cadeia epidemiológica da doença. Esse estudo teve objetivo de avaliar a efetividade de vacinas contra leishmaniose em cães bem como da utilização de coleira impregnada com inseticida através de um estudo de coorte realizado em uma região de transmissão moderada de leishmaniose visceral canina. Foram construídas seis coortes compostas por animais não reagentes ao teste rápido TR-DPP® e ao teste EIE-ELISA®. Todos os animais apresentaram estado clínico normal, conforme avaliação semiológica. As coortes compreendem grupos de animais sem qualquer medida de controle (grupo N), grupos de animais com aplicação de coleira (grupo C), grupos de animais vacinados com vacina de subunidade (grupo V1) e grupos de animais vacinados com vacina

recombinante (grupo V2) e grupos de animais vacinados e com coleira (grupos V1C e V2C). Foram colhidas amostras de todas as coortes em três tempos com intervalo de seis meses cada, para sorodiagnóstico. A efetividade encontrada ao final de 12 meses de observação para os grupos C, V1, V2, V1C e V2C foram 38,2%, 58,1%, 35%, 68,6% e -36,5% respectivamente com base nos cálculos estatísticos feitos por regressão de Cox para riscos proporcionais. Todas as coortes, mesmo tendo desempenhando alguma efetividade exceto V2C, os resultados dos intervalos de confiança do risco relativo não foram significativos quando comparados ao grupo controle (N).

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina. Estudo de coorte. Vacina. Coleira impregnada com inseticida. Métodos de controle. Efetividade.

ABSTRACT

LOPES, E. G. **Field study to evaluate the effectiveness of vaccination and insecticides impregnated collars to control canine visceral leishmaniasis.** [Estudo de campo para avaliação da efetividade de vacinação e de uso de coleiras impregnadas com inseticidas para o controle da leishmaniose visceral canina]. 2015. 72 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Leishmaniasis and particularly the LV are diseases transmitted by arthropod vectors candidates to experience a wide territorial expansion because of problems related to global warming. This weather event should cause great impact on the geographical distribution of the arthropod transmitter in Brazil and worldwide. Indeed, the past 20 years the epidemiological situation of LV in Brazil has been changing a prevalent sporadic pattern predominantly in rural areas to a condition of peri-urban epidemics that can affect all social strata of the population, making it a serious threat public health. Leishmaniasis are considered so far not preventable disease and its epidemiological pattern have been changing blatantly, which requires urgency to the development of new tools for control and treatment. Among the many questions raised about the demands on research related to the control of this disease, it highlights the importance of advances in quantitative epidemiological studies and mathematical modeling to anticipate vaccinations effects of employing immunogens effectively and / or lower vaccination coverage to 100%, which appears to be a reality with vaccines against leishmaniasis developed so far by laboratories worldwide. The success of effective strategies to control the LV depends on the knowledge of many aspects of the dynamics of infection in different populations and species that act in the epidemiological chain of the disease. This study aims to evaluate the effectiveness of vaccines against leishmaniasis in dogs as well as the use of insecticide impregnated collar with through a cohort study in a high transmission of canine visceral leishmaniasis region. It was built six cohorts composed of non-reactive animals to the rapid test DPP® and EIE-ELISA® test. All the animals had normal clinical status, as symptomatic evaluation. The cohorts include groups of animals without any measure of control (group N), group of animals with collar application (group C), groups of vaccinated animals with subunit vaccine (group V1), group of animals vaccinated with recombinant vaccine (group V2) and groups of animals vaccinated and collar application (V1C and V2C). Samples were collected from all cohorts in three times at

intervals of six months each for serodiagnosis. The effectiveness found after 12 months of observation for groups C, V1, V2, V1C and V2C were 38.2%, 58.1%, 35%, 68.6% and -36.5% respectively based on the statistical calculations done by Cox proportional hazards regression to. All cohorts, even though playing some effectiveness except V2C, the results of risk relative confidence intervals were not significant when compared to the control group (N).

Key-words: Canine visceral leishmaniasis. Cohort study. Vaccine. Insecticide impregnated collar. Control methods. Effectiveness.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– Área de estudo em destaque – cidade de Panorama – São Paulo.....	34
Figura 2 – Foto tirada por satélite da cidade de Panorama – SP com as divisões dos quatro setores	35
Figura 3 – Foto tirada por satélite da cidade de Panorama -SP	36
Figura 4 – Demonstração dos resultados do teste rápido TR-DPP®	39
Quadro 1 – Divisão dos animais em grupos conforme cada método de controle utilizado	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de cães participantes do estudo para avaliação de metodologias de controle de Leishmaniose Visceral, conforme classificação etária.....	38
Tabela 2 –	Resultados sorodiagnósticos nos animais do grupo C (coleira)	42
Tabela 3 –	Resultados sorodiagnósticos nos animais do grupo N (coorte controle).....	42
Tabela 4 –	Resultados sorodiagnósticos nos animais do grupo V1 (vacina 1)	43
Tabela 5 –	Resultados sorodiagnósticos nos animais do grupo V1C (vacina 1 com coleira).....	43
Tabela 6 –	Resultados sorodiagnósticos nos animais do grupo V2 (vacina 2)	43
Tabela 7 –	Resultados sorodiagnósticos nos animais do grupo V2C (vacina 2 com coleira).....	44
Tabela 8 –	Resultados das análises estatísticas para incidência, proteção, efetividade, risco relativo (RR) e intervalo de confiança do RR de todas as coortes.....	44

APÊNDICES

Apendice A – Fluxograma do experimento.....	63
Apendice B – Lista de todos animais participantes na pesquisa.	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Etiologia das leishmanioses	17
1.2	Transmissão da leishmaniose visceral	18
1.3	Manifestações clínicas da leishmaniose visceral	19
1.4	Epidemiologia e controle da leishmaniose visceral	20
1.4.1	Uso de coleiras impregnadas com inseticidas	22
1.4.2	Imunoprofilaxia	23
1.5	Diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral	28
1.5.1	Métodos indiretos – Sorodiagnóstico	28
1.5.1.1	<i>Reações imunoenzimáticas (ELISA/EIE®)</i>	29
1.5.1.2	<i>Reação imunocromatográfica (TR-DPP®)</i>	29
1.5.2	Métodos diretos - moleculares	30
2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	População em estudo	34
3.2	Estruturação das coortes	36
3.3	Abordagem dos animais	37
3.4	Provas sorodiagnósticas	39
3.5	Delineamento experimental	40
3.6	Estatística	41
4	RESULTADOS	42
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa de caráter zoonótico, que acomete os seres humanos, animais domésticos e silvestres, causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (BANETH et al., 2008). Sua transmissão é feita por meio de vetores dípteros denominados flebotomíneos, grupo que congrega várias espécies do gênero *Lutzomyia* (BATES et al., 2007). É uma das doenças parasitárias mais importantes do mundo e permanece um desafio para a saúde pública. Está presente na Ásia, África, Europa e nas Américas em mais de 88 países de regiões tropicais e subtropicais. Trezentos mil novos de LV casos ocorrem anualmente no mundo, sendo que 90% ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão. (DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006; SINGH, 2006; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009; DANTAS-TORRES et al., 2012; WHO 2013).

Nos últimos anos, a dispersão da infecção tem sido rápida, novos casos são registrados em áreas consideradas livres da doença, com destaque para regiões urbanas (PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009). No Estado de São Paulo a doença está em franca expansão, sendo detectada em 105 municípios paulistas (RANGEL et al., 2013). Os cães exercem um papel fundamental, pois são considerados como o principal reservatório urbano da leishmaniose visceral (VERCAMMEN et al., 1997; BANETH et al., 2008). O sacrifício dos cães soropositivos como instrumento para controle da LV vem gerando grande debate entre a comunidade científica, médicos veterinários, autoridades sanitárias e a comunidade em geral (RIBEIRO, 2005).

1.1 Etiologia das leishmanioses

No Brasil, a espécie mais frequentemente encontrada é a *Leishmania (Leishmania) chagasi* e os vetores mais comumente encontrados são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (ROSA E OLIVEIRA, 1997; BRASIL, 2006). Nas Américas, são atualmente reconhecidas onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença em humanos

e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis*. Mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2007a).

Segundo Mauricio et al. (1999) e Schönian et al. (2010), as espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* (novo e velho mundo respectivamente) são consideradas sinônimas de acordo com critérios moleculares. Entretanto, a nomenclatura taxonômica para o grupo de agentes associados à leishmaniose visceral americana vem sendo tema de intensa controvérsia entre os autores (DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006; LAINSON; RANGEL, 2006; SHAW, 2006).

1.2 Transmissão da leishmaniose visceral

Os vetores da LV, denominados de flebotomíneos, são pequenos dípteros de dois a três milímetros de tamanho, corcundas e muito pilosos, com as asas em forma de ponta de lança, mantidas eretas sobre o corpo quando pousados. No Brasil são popularmente conhecidos como asa branca, asa dura, birigui, cangalhinha, mosquito palha, tatuquira, frebóti, entre outras denominações (MARCONDES, 2001).

A maioria das espécies vive em florestas de vários tipos, cavernas ou cavidade entre pedras, geralmente em condições de alta umidade e de temperatura moderada. Podem invadir domicílios e anexos.

Os machos se alimentam de substâncias açucaradas de excreções de afídeos (pulgões). Já as fêmeas alimentam-se de substâncias açucaradas da seiva de vegetais e também de sangue de vários animais, sendo as responsáveis pela transmissão da leishmaniose (MARCONDES, 2001).

Geralmente, as fêmeas picam no crepúsculo ou à noite. A fêmea faz postura de aproximadamente 40 a 70 ovos em local úmido e protegido de luz, contendo matéria orgânica (MARCONDES, 2001). Nas estações de chuvas aumenta a população de *Lutzomyia longipalpis*, o que causa também um aumento da transmissão da leishmaniose (FRANÇA-

SILVA et al., 2005). As picadas nos animais ocorrem em áreas com poucos pelos como focinhos, orelhas e região genital (MARCONDES, 2001).

Quando o flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo, inocula a forma promastigota do parasito na derme do hospedeiro vertebrado. Ao picar o hospedeiro, são inoculadas as formas promastigotas que estão na probóscida, devido ao bloqueio do proventriculo no tubo digestivo causado pela intensa multiplicação do parasito (MARCONDES, 2001). Na corrente sanguínea, invadindo as células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), as formas promastigotas se desenvolvem para as formas amastigotas, se multiplicando dentro dos macrófagos, causando o rompimento destas células e disseminando o agente para órgãos ricos em células do SFM (RAMOS et al, 1994; NEVES et al., 2003). Ao picar um animal infectado, o flebótomo ingere e armazena a forma amastigota do parasito sem lhe causar nenhum dano, e após seis dias, o parasito já se encontra na forma infectante (promastigota), quando o flebótomo poderá transmitir a doença para outros vertebrados (PENNACCHI; RENDA, 2000). Quando um flebotomíneo ingere as formas amastigotas, estas se diferenciam e se multiplicam por divisão binária em formas promastigotas que são as formas infectantes, ocorrendo multiplicação em várias partes do tubo digestivo (MARCONDES, 2001).

Outros estudos indicam que a transmissão da LV pode ocorrer por transfusão sanguínea (FREITAS, et al., 2006). Por pulgas e carrapatos ainda não se sabe ao certo sobre a capacidade vetorial. No entanto, a presença do parasito foi encontrada no carrapato após dez dias da retirada do animal infectado, o que pode indicar a possibilidade da transmissão por carrapatos. (COUTINHO et al., 2005; COLOMBO et al., 2011).

1.3 Manifestações clínicas da leishmaniose visceral

As manifestações clínicas da LV em cães variam conforme o período de incubação, que pode ser de um mês a sete anos (GREENE, 2006; NELSON; COUTO, 2006; MIRÓ et al., 2008). Geralmente cães sintomáticos apresentam febre, emagrecimento, anemia, lesões na pele, alopecia, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, onicogribose, entre outros sinais (FEITOSA et al., 2000). A infecção causa elevada produção de imunocomplexos que ficam circulantes até se depositarem nos tecidos. A deposição dos imunocomplexos nos vasos

sanguíneos causa as principais complicações da leishmaniose como vasculite, poliartrite, uveíte e glomerulonefrite (GREENE, 2006; NELSON; COUTO, 2006).

1.4 Epidemiologia e controle da leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral é uma das doenças infecciosas mais importantes, com uma distribuição mundial e endêmica em ao menos 88 países, e é classificada uma das seis maiores doenças tropicais pela Organização Mundial de Saúde (OMS) devido ao seu notável impacto na saúde pública global (DESJEUX, 2004; WHO, 2013). Na América Latina, a LV já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos notificados ocorrem no Brasil (MILLES et al., 1999).

As principais áreas endêmicas encontram-se na região Nordeste do país, do Maranhão até a Bahia e também no Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás, Espírito Santo e São Paulo (REY, 2001). A LV está registrada em 20 dos 27 estados brasileiros (BRASIL, 2006; LEAL, et al., 2009).

No Estado de São Paulo vem se verificando um processo de expansão da doença, à medida que acontece adaptação do vetor à zonas urbanas (CAMARGO-NEVES; GOMES; ANTUNES, 2002; CAMARGO-NEVES, 2004a). Em novembro de 2011, a transmissão de leishmaniose visceral estava presente em 105 municípios, sendo que 70 apresentaram casos humanos e caninos autóctones, cinco municípios registram somente casos humanos autóctones, sem detecção de autoctonia canina (Álvaro de Carvalho, Jaú, Marília, Parapuã e Quintana) e 30 municípios apresentam somente transmissão canina (RANGEL et al., 2013).

Entre os principais responsáveis pelos níveis epidêmicos da LV nos grandes centros destacam-se o estreito convívio entre o homem e os reservatórios, o aumento da densidade do vetor, o desmatamento acentuado, o crescimento desordenado das cidades e o constante processo migratório (DESJEUX, 2004). A devastação de áreas silvestres fez com que vetores e hospedeiros silvestres migrassem para o peridomicílio humano em busca de meios de sobrevivência (GONTIJO; MELO, 2004).

A espécie *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da LV, foi detectada em 125 municípios do Estado de São Paulo. Destes, 92 apresentam transmissão canina e/ou humana de leishmaniose visceral (SÃO PAULO 2006; CVE, 2011).

No Brasil, os cães são os principais reservatórios da LV para seres humanos, muito embora reservatórios silvestres como o cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) e marsupiais do gênero *Didelphis* parecem desempenhar algum papel na epidemiologia desta zoonose (SHERLOCK et al., 1984; LAINSON; SHAW, 1987; SHERLOCK, 1996).

O tratamento de cães não é recomendado, visto que existem controvérsias em relação à cura parasitológica, apesar da cura clínica. Com efeito, na vigência de cães sorologicamente positivos recomenda-se a eutanásia humanitária, segundo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde, 2006 (BRASIL, 2006).

A complexidade do agente causal e a adaptabilidade dos vetores aos diferentes ecossistemas dificultam as estratégias de controle e profilaxia. Portanto o controle efetivo da doença somente será alcançado com a adoção de programas sistemáticos e simultâneos considerando os diversos elos da cadeia epidemiológica (CAMARGO-NEVES et al., 2007).

O programa brasileiro de controle da leishmaniose baseia-se em três estratégias: diagnóstico precoce e tratamento de casos humanos; triagem sorológica em cães e sacrifício dos animais soropositivos e emprego de inseticidas em áreas de focos notificados (LACERDA, 1994). Apesar de tais medidas, entretanto, a prevalência desta doença vem aumentando consideravelmente em diversas regiões do País (COSTA; VIEIRA, 2001).

A eliminação de cães soropositivos é uma medida de eficácia questionável, em virtude da dificuldade em se precisar o número de animais a ser eliminados com vistas ao decréscimo da incidência da doença em população humana (DESJEUX, 2004). Nunes e colaboradores mostraram não haver correlação estatística entre a incidência de LV em humanos e eutanásia de cães no município de Araçatuba, SP quando estes dois parâmetros foram avaliados em períodos simultâneos ou com um ano de diferença. Neste trabalho, a correlação entre a eliminação de cães e a redução de casos humanos só foi demonstrada quando estes eventos eram separados por dois anos de diferença (NUNES et al., 2010). Por outro lado, a eliminação de cães não teve efeito na redução de casos humanos em três outros estudos no Brasil (DIETZE et al., 1997; PARANHOS-SILVA et al., 1998; COURTENAY et al., 2002). Nestes casos, a ineficácia da medida de controle poderia ter sido devido às condições da população estudada (populações rurais) ou pelo atraso que normalmente era observado entre o diagnóstico do cão soropositivo e sua eliminação da população, o que permitiria que o mesmo participasse como fonte de infecção por um tempo considerável até que a medida de controle de fato fosse adotada. Finalmente, há que se considerar que a eliminação de cães é uma medida difícil e onerosa de ser implantada além de extremamente antipática à população (ASHFORD, 1996).

Assim, outras estratégias de controle da LV vêm sendo propostas para o controle da doença em populações caninas, como o uso de coleiras impregnadas com inseticidas repelentes ao vetor e a imunoprofilaxia.

1.4.1 Uso de coleiras impregnadas com inseticidas

O uso de coleiras impregnadas com inseticidas é uma estratégia que mostrou eficácia na proteção de cães em relação à picada do mosquito (KILLICK- KENDRICK et al., 1997; MAROLI et al., 2001; DAVID et al., 2001; GAVGANI et al., 2002; REITHINGER et al., 2004). No mercado brasileiro é comercializada a coleira impregnada com deltametrina 4%, denominada Scalibor® (MSD Saúde Animal). Em um estudo realizado em área endêmica no Estado de Minas Gerais, foi possível observar reduções de 50% nas razões de odds para soroconversão para *Leishmania* spp. em coortes de cães com coleira (n=136) e sem coleira (n=97) (REITHINGER et al., 2004). Em trabalho similar realizado na região da Ligúria, Itália, Ferroglio e colaboradores demonstraram que o risco de infecção na população não exposta foi reduzido em 84% (FERROGLIO et al., 2007). Neste caso, os autores estudaram o uso de coleira e uso de medicação inseticida em formulação *spot-on*, em duas coortes distintas (n=120 e n=119, respectivamente) e verificaram a mesma taxa de redução de risco. Este tipo de intervenção demonstrou-se razoavelmente bem sucedido também em uma região no Irã, onde os autores verificaram que cães com coleiras impregnadas estiveram sob menor risco de soroconversão para infecção por *Leishmania* spp. Neste caso, foi possível verificar uma redução significativa também na incidência da leishmaniose em crianças nas vilas que os cães foram encoleirados. Esta redução presumivelmente pode ser devida não só a diminuição do repasto de insetos em decorrência do poder repelente da coleira como também ao aumento da mortalidade dos vetores (GAVGANI et al., 2002). No município de Andradina, SP foi feito um estudo de coorte no período de 2002 a 2004, para avaliação da efetividade da coleira impregnada com inseticida (deltametrina 4%) para o controle da doença. Foram encoleirados todos os cães negativos no inquérito sorológico anteriormente realizado, sendo todos domiciliados e cadastrados. Eles observaram uma diminuição no número de casos e no coeficiente de incidência em humanos, registraram apenas 2 casos e uma incidência de 3,6

casos/100.000 habitantes. Observaram também uma diminuição na prevalência canina, sendo inferior a 5% no final do estudo (CAMARGO-NEVES et al., 2004b).

1.4.2 Imunoprofilaxia

Imunoprofilaxia em cães que possa de fato reduzir o risco de manutenção destes animais como reservatórios e, por conseguinte reduzir a transmissão para a população humana é uma estratégia recomendada por autoridades sanitárias no Brasil. Também se recomenda que a vacina contra leishmaniose canina não cause interferência no reconhecimento de animais naturalmente infectados (BRASIL, 2006).

As vacinas que vêm sendo elaboradas para a prevenção da LV canina são classificadas de acordo com a tecnologia empregada na confecção das mesmas. As vacinas elaboradas a partir do extrato bruto do agente infeccioso vivo ou morto são denominadas de primeira geração. Já as que utilizam antígenos purificados ou antígenos expressos por bactérias recombinantes são as de segunda geração. As de terceira geração são as vacinas produzidas a partir de genes que codificam antígenos do agente infeccioso transportados por plasmídeos de DNA (rDNA) (GRADONI, 2001; PALATNIK-DE-SOUZA, 2008). Recentes pesquisas procuram desenvolver vacinas para conferir imunidade contra a LV a partir de proteínas da saliva de flebotomíneos. Segundo Gomes et al. (2008), o uso da proteína salivar LJM19 foi eficaz na imunização de hamsters contra infecção por *L. infantum*. Collin (2009) relata que as proteínas LJM17 e LJM143 utilizadas na imunização de cães induziu resposta humoral com predominância de anticorpos IgG2 durante todo período de estudo e produção significativa de interferon- γ (IFN- γ) por células T CD3+ e CD4+, indicando um perfil Th1 de resposta. Tais resultados indicam um futuro promissor para estudos em condições naturais. No Brasil, um estudo testou a imunização de cães com uma vacina de primeira geração, produzida a partir do antígeno de *L. amazonensis* associada ao BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) como adjuvante necessitando, porém de mais estudos (ARAÚJO et al., 2011).

O desenvolvimento de uma vacina requer a submissão a quatro etapas de experimentação (BRASIL, 2007a). São elas: Fase I: estudos de segurança para demonstrar a ausência de efeitos colaterais adversos relevantes em animais saudáveis, sensíveis ao agente em estudo, em condições de laboratório. Fase II: nessa fase, além de confirmar a segurança, será

determinada a imunogenicidade, a via de administração, a dose e esquema que serão utilizados na Fase III, bem como a estimativa preliminar da eficácia em animais sensíveis da espécie-alvo. Fase III: destina-se à realização de estudos controlados, randomizados e mascarados para avaliar a eficácia vacinal. Fase IV: compreende a fase de vigilância e pesquisa pós-registro do produto. O Brasil foi o primeiro país no mundo a conceder licença para vacinas contra LV canina (FOROUGH-PARVAR; HATAM, 2014).

No Brasil, dois fabricantes distribuem vacinas contra a LV canina, com licenças expedidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mas cuja recomendação para uso em Saúde Pública não é ratificada pelo Ministério da Saúde (MS). A manutenção da licença expedida às duas formulações imunobiológicas depende de resultados a serem conferidos em testes de Fase III, referentes à eficácia vacinal avaliada em testes de campo, segundo as exigências da Instrução Normativa Interministerial Nº 31, de 09 de julho de 2007 (BRASIL, 2007b).

A primeira vacina licenciada no Brasil, denominada Leishmune® (Zoetis™ Brasil) é uma vacina de subunidade na qual são utilizados antígenos extraídos do protozoário que são purificados a partir da fração solúvel em água e estabilizados em condições desnaturantes. Esta fração antigênica, denominada complexo glicoprotéico FML (*fucose-mannose-ligand*) é composta por açúcares neutros (fucose, manose, glicose, galactose) (29%), proteínas (44%) e carboidratos (11%) (PALATNIK et al., 1989). A glicoproteína GP63 constitui-se a principal fração protéica imunogênica do complexo FML (PALATNIK DE SOUZA; DUTRA; BOROJEVIC, 1993).

O complexo FML foi isolado de formas promastigotas de *L. donovani* e é capaz de inibir infecções *in vitro* em macrófagos de camundongos por formas amastigotas e promastigotas deste agente (PALATNIK et al., 1989; PALATNIK DE SOUZA; DUTRA; BOROJEVIC, 1993). Presente na superfície do parasito, antígenos FML foram demonstrados serem potentes imunógenos para camundongos e coelhos além de antígenos eficientes para uso em sorodiagnóstico de infecções em humanos e caninos (PALATNIK et al., 1989; PALATNIK DE SOUZA; DUTRA; BOROJEVIC, 1993, 1995; SANTOS et al., 1999, 2002).

A formulação da vacina com FML conferiu proteção de 87,7% e 84% contra a doença induzida por infecção experimental com *L. donovani* para linhagens isogênicas de hamster CB e camundongos Balb/c, respectivamente. Como critério para avaliar proteção empregou-se parâmetros como manutenção de hipersensibilidade tardia contra antígenos do agente, redução de esplenomegalia e carga parasitária, aumento da proliferação *in-vitro* de esplenócitos contra

antígenos de leishmania e aumento de título da resposta humoral a antígenos FML (PALATNIK DE SOUZA et al., 1994a, b).

Testes de fase III da vacina Leishmune® realizados em uma área endêmica para leishmaniose visceral no Brasil determinaram a eficácia vacinal usando coortes de 58 animais imunizados e 59 animais com tratamento placebo. Decorridos 24 meses do início do experimento, animais soro-reagentes ao antígeno FML e considerados sintomáticos para LV foram removidos do estudo para pesquisa de reação imune e testes parasitológicos. No final, os autores relatam proteção vacinal de 92%. Como 33% dos animais não vacinados e 8% dos vacinados adoeceram com comprovação laboratorial de LV, a eficácia para a proteção contra a doença poderia ser determinada como 76% (DA SILVA et al., 2001).

Em outro estudo, 85 cães foram distribuídos em dois grupos com 44 e 41 animais cada, sendo o primeiro grupo composto de animais vacinados e o segundo, de animais controle. Ao final de 41 meses de experimento, 25% dos animais não vacinados e 5% dos vacinados desenvolveram sinais clínicos de LV com comprovação da presença do parasito (BORJA-CABRERA et al., 2002). Neste caso, a eficácia vacinal foi calculada como 80%.

No intuito de verificar se animais vacinados podem permanecer como fontes de infecção a despeito de estarem protegidos contra a doença, Nogueira e colaboradores acompanharam duas coortes de cães residentes em área endêmica para LV (NOGUEIRA et al., 2005). Decorridos 11 meses, a coorte de animais não vacinados apresentava 25% dos cães com sintomas, 50% de soropositividade (revelada por FML-ELISA), 56,7% dos cães com presença do agente em linfonodos (revelado por PCR), 15,7% dos cães com presença do agente no sangue (revelado por PCR) e 25% dos cães com presença do agente em pele (revelada por prova imunohistoquímica). Em contraste, nenhum dos animais vacinados teve o parasita detectado pelos métodos diretos citados. A ausência de sintomas e do parasito na coorte de animais vacinados indica que os mesmos não devem permanecer como fonte de infecção do agente.

Outras propriedades dos antígenos FML vêm sendo estudadas com resultados satisfatórios como a capacidade imunoterapêutica para redução de sinais clínicos em animais infectados e assintomáticos e para redução da infectividade para o vetor flebotomíneo (BORJA-CABRERA et al., 2004, 2008; SARAIVA et al., 2006; SANTOS et al., 2007), bem como testes em escala populacional vem mostrando que a vacina apresenta segurança aceitável (PARRA et al., 2006).

A resposta celular é declaradamente a defesa mais eficaz para infecção, no entanto, a vacina também estimula um pico de produção de anticorpos, com 98% após 30 dias em cães

de áreas endêmicas (LEISHMUNE, 2004). Embora muito desejável, a soroconversão pode ser um problema adicional. Os altos níveis de anticorpos estimulados pela vacina Leishmune® podem ser temporariamente detectados pelas técnicas de sorodiagnóstico padrão, fazendo com que cães vacinados sejam erroneamente confundidos com cães naturalmente infectados (MENDES et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005; CARDOSO et al., 2007; DE AMORIM et al., 2010; MARCONDES et al., 2013).

Um aspecto importante relacionado ao uso do complexo antígeno glicoprotéico FML é que, mesmo tendo sido isolado de *L. donovani*, agente da doença na África e Ásia, este imunógeno confere proteção cruzada contra infecção por *L. chagasi* e *L. infantum*, agentes da doença canina nas Américas e na Europa (PALATNIK DE SOUZA et al., 1995).

Em setembro de 2014, a vacina Leishmune® teve sua licença de fabricação e comercialização suspensa, por determinação do ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), devido ao não cumprimento do regulamento técnico para pesquisa, desenvolvimento, produção, avaliação, registro e renovação de licenças, comercialização e uso de vacina contra leishmaniose visceral canina aprovada pela instrução normativa interministerial 31/2007. A vacina não atendeu completamente os requisitos para os estudos de fase III, referente à avaliação da eficácia vacinal, conforme avaliação realizada pelo MAPA e Ministério da Saúde (BRASIL, 2014).

Outra vacina distribuída no mercado brasileiro é uma vacina recombinante denominada Leish-tec® (Hertape Calier S.A.). Uma das vantagens de vacinas recombinantes relaciona-se ao fato de que é possível empregar antígenos bem caracterizados, em que todas as propriedades imunogênicas (epítomos) das diferentes porções da molécula possam ser identificadas e caracterizadas. No caso do gênero *Leishmania*, o antígeno A2, que atualmente é considerado o antígeno melhor caracterizado, demonstrou ser capaz de induzir uma resposta imune protetora contra LV canina. Esse antígeno é um fator de virulência de *Leishmania*, associado à capacidade de visceralização dos parasitas (COELHO et al., 2003; ZANIN, et al., 2007).

O antígeno A2 é uma proteína específica do estágio amastigota de várias espécies do gênero *Leishmania* e foi identificado inicialmente na espécie *L. donovani* por Charest e Matlashewski (1994). Análises cariotípicas realizadas por *Southern-blot* de várias espécies do gênero *Leishmania* revelaram que os genes A2 são conservados para as espécies *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*, o que é importante para indução de proteção cruzada entre espécies diferentes (GHEDIN et al., 1997).

Estudos demonstraram que o antígeno A2, específico do estágio amastigota do gênero *Leishmania*, tem potencial como antígeno vacinal, pois anticorpos anti-A2 foram detectados em amostras de soro de pacientes e cães acometidos pela leishmaniose visceral, mostrando que a proteína A2 é altamente antigênica (GHEDIN et al., 1997; CARVALHO et al., 2002).

A vantagem desta vacina em relação à Leishmune® diz respeito ao fato de o antígeno A2 ser expresso apenas pelas formas amastigotas do parasito, portanto, exclusivo da forma que parasita o hospedeiro vertebrado. Os testes sorológicos empregados para detecção de resposta imune nos hospedeiros vertebrados baseiam-se em antígenos da forma promastigota do parasito, que não expressa o antígeno A2. Este fato é importante ser ressaltado, pois animais vacinados com a vacina recombinante produzirão anticorpos apenas contra proteínas que não podem ser encontradas em formas promastigotas, o que não acontece com animais naturalmente infectados. Isto permite diferenciar animais naturalmente infectados de animais vacinados, desde que os testes sorod diagnósticos sejam realizados com antígenos de formas promastigotas.

Testes preliminares empregando o antígeno A2 como imunógeno mostraram que, de sete animais vacinados e posteriormente infectados, em quatro o parasito foi encontrado em medula óssea e em cinco mantiveram-se assintomáticos. No grupo de sete animais infectados experimentalmente e não vacinados, em todos eles o parasito foi isolado de medula óssea e apenas dois mantiveram-se assintomáticos. Neste trabalho, o antígeno A2 revelou-se imunogênico, induziu proteção parcial e não interferiu no diagnóstico convencional, pois todos os cães mantiveram-se soronegativos após a imunização e antes do desafio (FERNANDES et al., 2008). Nos testes de fase III, 1650 cães foram vacinados em uma área endêmica (Porteirinha, Estado de Minas Gerais) e foram acompanhados por um ano, 96% dos animais permaneceram não infectados até o final do período, demonstrando uma eficácia vacinal de 71% com base nos resultados de cultura de aspirado de medula óssea. Nos animais que apresentaram anticorpos anti-A2 em resposta à Leish-Tec®, foi encontrado 82% de eficácia vacinal (FERNANDES et al., 2012).

Existe ainda uma terceira vacina contra LV canina lançada em 2011, a LiESP/QA21 sob o nome comercial CaniLeish® (Virbac Group), porém comercializada apenas na União Européia. Esta vacina é composta por proteínas excretadas-secretadas de *L. infantum* (LiESP) e adjuvante saponina QA21. No trabalho de Moreno (2012), os cães vacinados desenvolveram resposta imune humoral e celular após o esquema vacinal. Em outro trabalho realizado no sul da França, foi feito um estudo duplo cego em cães vacinados com CaniLeish® e naturalmente

expostos, a incidência de infecção foi de 0,61% (1/165), enquanto que no grupo controle foi de 6,86% (12/175) obtendo uma eficácia vacinal de 92% (LEMESRE et al., 2007).

1.5 Diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral

O diagnóstico da LV, assim como o de outras leishmanioses, constitui-se um desafio para o investigador, devido à grande variedade de sintomas da doença e à grande porcentagem de indivíduos assintomáticos (FERRER, 1999).

Outro aspecto relevante em relação ao diagnóstico das leishmanioses diz respeito à especificidade dos métodos laboratoriais tradicionalmente empregados, em virtude da diversidade de parasitos encontrados nas regiões brasileiras há a possibilidade de ocorrer reações cruzadas nos testes diagnósticos. Algumas regiões podem ser endêmicas tanto para *L. chagasi*, agente causal da LV, quanto para *L. braziliensis* agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana, ou ainda para *Trypanossoma cruzi* agente da doença de Chagas (PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009).

Segundo nota técnica do Ministério da Saúde (MS), Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis de dezembro de 2011, o teste rápido imunocromatográfico TR-DPP Bio-Manguinhos passou a ser o teste de triagem nos inquéritos caninos e o ELISA, o teste confirmatório (BRASIL, 2011).

Antes dessa data, era recomendado pelo manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo, que o diagnóstico em cães fosse feito utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA) como triagem e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) como confirmatório (SÃO PAULO, 2006; RANGEL et al., 2013).

1.5.1 Métodos indiretos – Sorodiagnóstico

Estão descritos a seguir os testes imunocromatográfico (teste rápido *Dual Path Platform* TR-DPP®) e a reação imunoenzimática (ELISA/EIE®), métodos indiretos utilizados para o sorodiagnóstico dos animais.

1.5.1.1 Reações imunoenzimáticas (ELISA/EIE®)

O ELISA/EIE® – “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*” - Ensaio Imunoenzimático Kit Bio-Manguinhos FIOCRUZ licença no Ministério da Agricultura (utilizado no Programa de Controle da LVA pela Secretaria de Saúde de São Paulo e Ministério da Saúde), é o ensaio destinado a investigação da resposta humoral (detecção de anticorpos IgG circulantes) contra *Leishmania* (SÃO PAULO, 2006). O teste consiste na reação de soros de cães com antígenos solúveis purificados de promastigotas de *Leishmania* obtidos a partir de cultura “*in vitro*”, que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas de 96 poços (Fase Sólida), conforme descrito no manual do Kit. A seguir adicionam-se, devidamente diluídos, os soros controles do teste e as amostras a serem analisadas, que possuindo anticorpos específicos, irão se fixar aos antígenos. Na etapa seguinte, ao se adicionar um conjugado anti-imunoglobulina total de cão marcada com a enzima peroxidase, esta se ligará aos anticorpos caso estejam presentes. Para evidenciação da reação, utiliza-se uma substância cromógena (Tetrametilbenzidina – TMB) que pela ação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio forma um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico que interrompe a reação, passa a apresentar uma coloração amarela quando positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). A leitura é feita em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan MS) a densidade óptica (D.O.) será obtida por leitura a 492 nm e os valores de corte (“Cut-off” = CO): $CO = \text{média dos controles negativos} \times 2$

1.5.1.2 Reação imunocromatográfica (TR-DPP®)

O teste rápido *Dual Path Platform* (TR-DPP® Bio-manguinhos FIOCRUZ) é um teste imunocromatográfico qualitativo, utilizado na detecção de anticorpos em amostras de sangue,

soro ou plasma. Este teste emprega uma combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos da amostra para *Leishmania*. Em sequencia reage com antígenos recombinantes K28 de *L. chagasi* ligados a uma membrana (fase sólida). O resultado positivo é considerado através do sinal de cor gerado.

A amostra é aplicada ao poço #1 (amostra + tampão), seguida pela adição do tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Após a migração da amostra e do tampão ao longo do suporte de teste, adiciona-se tampão de corrida ao poço #2 (tampão). O conjugado se liga aos anticorpos específicos para *Leishmania* produzindo uma linha rosa/roxa na área do TESTE (T). Na ausência de anticorpos para *Leishmania* a linha rosa/roxa não aparece na área do TESTE (T). Em ambos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma linha rosa/roxa na área de CONTROLE (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes (BIO-MANGUINHOS, 2011).

1.5.2 Métodos diretos - moleculares

O método mais empregado para diagnóstico molecular de leishmaniose é a detecção do DNA do parasito pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). Esta prova permite a amplificação seletiva de sequencias do DNA do parasito, o que consequentemente viabiliza um instrumento diagnóstico espécie-específico para as doenças infecciosas (DEGRAVE et al., 1994).

A reação da PCR mostra-se muito sensível para a detecção de casos incipientes (REY, 2001). A PCR pode ser feita com o DNA extraído da medula óssea, biopsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados e também no vetor (FERRER, 1999; GREENE, 2006). A técnica da PCR é eficiente para detectar os estágios iniciais das infecções, enquanto as técnicas sorológicas são mais eficazes para diagnosticar estágios avançados da infecção (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Diversos marcadores podem ser usados na PCR para detecção e identificação de *Leishmania* spp., como o gene codificador da menor unidade ribossômica (VAN EYS et al., 1992; ULIANA et al., 1994), o espaçador interno transcrito 1 (ITS-1) (KUHLS et al., 2005; NASEREDDIN et al., 2006), as sequencias mini-exon (*spliced leader* RNA) (HARRIS et al.,

1998; MARFURT et al., 2003; MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2004), genes codificadores de antígenos gp63, gene β -tubulin (DA SILVA et al., 2004; CORTES, et al., 2006; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009), sequencias microssatélites (BULLE et al., 2002) e o DNA extra nuclear como os minicírculos de kinetoplasto (kDNA) (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990; REALE et al., 1999; MAHBOUDI et al., 2002; VOLPINI et al., 2004; PENNISI et al., 2005).

Para a detecção de *Leishmania* spp., o DNA alvo mais empregado são as sequencias de minicírculo do kinetoplasto (kDNA) (MANNA et al., 2004; CORTES et al., 2004; PENNISI et al., 2005; ANDRADE et al., 2006). Este marcador possui uma característica única que possibilita a discriminação de complexos, espécies, subespécies, estirpes e até isolados de *Leishmania* spp., dependendo da região gênica que for pesquisada (GUERIN et al., 2002). Nestes casos, a PCR com este marcador mostra-se muito sensível para detectar casos incipientes de leishmaniose, principalmente pelo fato de estes *loci* apresentarem-se em muitas cópias (~10.000 cópias) por célula do parasito (DEGRAVE et al., 1994; NOYES et al., 1998; REY, 2001).

Em virtude do impacto da LV em Saúde Pública, é indispensável à correta identificação de indivíduos infectados por meio de métodos diagnósticos rápidos e acurados, particularmente para o caso de cães assintomáticos e oligossintomáticos, importantes elementos da cadeia epidemiológica desta zoonose (LANGONI et al., 2005).

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

As leishmanioses e particularmente a LV são doenças transmitidas por vetores artrópodes candidatas a experimentar uma grande expansão territorial em virtude de problemas relacionados ao aquecimento global. Este evento climático deverá causar grande impacto sobre a distribuição geográfica do artrópode transmissor no Brasil e no mundo (RANDOLPH, 2010). Com efeito, nos últimos 20 anos a situação epidemiológica da LV no Brasil vem se modificando de um padrão esporádico prevalente eminentemente em áreas rurais para uma condição de epidemias peri-urbanas que pode afetar todos os estratos sociais da população, tornando-se uma séria ameaça à saúde pública (COSTA, 2008). De acordo com o Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doenças, as leishmanioses estão entre as dez doenças transmitidas por vetores artrópodes com maior potencial de ameaça ao continente europeu (SENIOR, 2008). Trezentos mil novos casos ocorrem anualmente de LV no mundo, sendo que 90% ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2013).

As leishmanioses são consideradas até o momento doenças de difícil prevenção e seu padrão epidemiológico vêm se alterando de forma flagrante, o que demanda urgência para o desenvolvimento de novas ferramentas de controle e tratamento (COSTA et al., 2011). Dentre as diversas questões levantadas sobre as demandas em pesquisa relacionadas ao controle desta enfermidade debatidas durante o Simpósio Internacional de Leishmanioses (COSTA et al., 2011), destaca-se a importância de avanços em estudos de epidemiologia quantitativa e modelagem matemática que permitam prever efeitos de vacinações de populações empregando-se imunógenos com eficácia e/ou cobertura vacinal menor que 100%, o que parece ser uma realidade com as vacinas contra leishmanioses desenvolvidas até então pelos laboratórios no mundo todo.

O sucesso de estratégias eficazes para o controle da LV depende do conhecimento de diversos parâmetros da dinâmica de infecção nas diferentes populações e espécies que atuam na cadeia epidemiológica da doença.

Nesse sentido, propõe-se o presente estudo com o objetivo de avaliar a efetividade de vacinas contra leishmaniose em cães bem como da utilização de coleira impregnada com

inseticida e associações através de um estudo de coorte a ser realizado em uma região de alta transmissão de leishmaniose visceral canina.

O conhecimento de valores relacionados à cobertura vacinal, efetividade vacinal e efetividade de emprego de coleiras impregnadas com inseticidas repelentes deverá fornecer subsídios importantes para estudos de modelagem de infecções com vistas ao estabelecimento de medidas de controle desta importante zoonose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e a metodologia empregados no presente estudo são descritos nos itens seguintes.

3.1 População em estudo

O estudo foi realizado no município de Panorama, região do oeste paulista, área com elevada incidência da doença. A situação epidemiológica é de transmissão humana e canina com presença do vetor transmissor, fatores que classificam a cidade de acordo com o boletim epidemiológico paulista (BEPA) como município de transmissão moderada (RANGEL et al., 2013).

O município de Panorama está localizado a noroeste do Estado de São Paulo (S21°21'00" e O51°51'36") com área 356km² e população de 14.583 habitantes. A figura 1 apresenta o mapa do Estado de São Paulo com destaque para a área de estudo.

Figura 1– Área de estudo em destaque – cidade de Panorama – São Paulo

Fonte: (LOPES, E. G., 2015)

A cidade foi dividida em quatro setores (Figura 2) e os domicílios foram visitados para colheita de soro de cães para inquérito censitário juntamente com a equipe técnica do serviço oficial da Prefeitura do Município de Panorama. A visita foi feita casa a casa, quadra a quadra, até completar o setor, cobrindo, na sequência, todo o perímetro urbano do município. Para a coleta a campo foi constituída uma equipe multidisciplinar formada por veterinários e agentes de saúde da vigilância epidemiológica do município e integrantes da equipe deste projeto.

Figura 2 – Foto tirada por satélite da cidade de Panorama – SP com as divisões dos quatro setores

Fonte: (LOPES, E. G., 2015)

Foto de satélite do Google Maps, com marcações de setores realizadas LOPES, E. G.

Os cães revelados soropositivos pelo teste rápido (TR-DPP®) foram identificados no mapa e um setor circular completo com raio de 100 metros em torno de cada cão soropositivo foi definido. Em seguida, os cães soronegativos pertencentes a este setor foram aleatoriamente selecionados, revisitados e submetidos a uma das seis intervenções descritas no quadro 1 (coortes). Todas as coortes tiveram representantes de cada grupo etário, classificados em: jovem (até 1 ano); adulto (de 1 até 8 anos) e idoso (acima de 8 anos), como demonstrado na tabela 1.

Os pontos visitados foram marcados com auxílio de equipamento para registro de posicionamento global GPSmap 60CS da Garmin® e, através de softwares MapSource® Garmin® versão 6.16.3 e Quantum GIS® (QGIS) versão 1.8.0 Lisboa, os pontos foram

plotados no mapa da cidade permitindo a visualização de todas as casas que tiveram cães amostrados. A figura 3 mostra os pontos plotados segundo procedimento descrito acima.

Figura 3 – Foto tirada por satélite da cidade de Panorama-SP

Fonte: (LOPES, E. G., 2015)

Foto tirada por satélite da cidade de Panorama – SP marcada com os pontos de GPS (marcações em roxo) e visualizadas através do programa de computador Quantum GIS® (QGIS) versão 1.8.0 Lisboa onde foram feitas coletas no setor 1

3.2 Estruturação das coortes

Foram construídas seis coortes compostas por animais com resultado não reagente ao teste rápido TR-DPP®. Todos os animais apresentavam estado clínico normal, conforme avaliação semiológica.

As coortes compreendem grupos de animais sem qualquer medida de controle, grupos de animais com aplicação de coleira, grupos de animais vacinados com vacina de subunidade e grupos de animais vacinados com vacina recombinante e associações (quadro 1).

Para o cálculo do tamanho das coortes, utilizou-se o programa Epi-Info v6.01. Considerou-se a incidência da doença nos animais sem coleira como sendo igual a 40% (BORTOLETTO, 2011) e uma proteção esperada da coleira 72,3% (FOGLIA MANZILLO et al., 2006), ou seja, uma incidência de aproximadamente 11% entre os indivíduos com coleira. Considerando-se confiança de 95% e um poder de 80% para o estudo estimou-se o tamanho dos grupos como sendo igual a 41 indivíduos. Já para a coorte de vacinados para as duas

vacinas, considerou-se a eficácia de 76% (BORJA-CABRERA et al., 2008; FERNANDES et al., 2012) esperando-se, desse modo, uma incidência máxima 9,6% entre os vacinados. Considerando-se confiança de 95% e um poder de 80%, o tamanho da amostra das coortes foi estimado como sendo igual a 37 indivíduos. Desse modo, optou-se por constituir todas as com pelo menos 41 indivíduos o que garante, para todos os objetivos, poder de 80% e confiança de 95%.

3.3 Abordagem dos animais

Foram selecionados 381 animais para as seis coortes (apêndice B). Todos tiveram seus domicílios visitados um total de quatro vezes (incluindo a visita do inquérito censitário) e foram submetidos a três intervenções com intervalo de seis meses cada, para aplicação de medidas de controle e para colheita de amostras de soro para realização de provas sorodiagnostics.

Os proprietários de cães soronegativos foram convidados a participar do experimento e então, informados sobre as condições do mesmo e aqueles que desejaram participar, assinaram termo de livre esclarecimento conforme instruções da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP. (Este projeto foi aprovado pelo comitê sob processo nº 2370/2011).

Uma questão de extrema importância que foi considerada nesta pesquisa diz respeito ao cuidado tomado para o momento da aplicação da medida de controle. Esta aplicação aconteceu no menor tempo possível decorrido o diagnóstico do indivíduo. Isto aconteceu porque, em uma área de alta prevalência, um cão revelado negativo tem razoável chance de se tornar soropositivo em curto período de tempo. Assim, tão logo um cão tivesse seu *status* sorológico conhecido, a equipe executora do projeto mobilizou-se para localizá-lo, incluí-lo na respectiva coorte e aplicar a respectiva medida de controle. Para este trabalho, definiu-se que o tempo máximo de espera entre colheita de amostra para o primo-diagnóstico e a aplicação da medida de controle fosse de 48 horas.

Parte dos animais soronegativos pelo TR-DPP® diagnosticados durante o inquérito censitário foram divididos nas seguintes coortes, esquematizados no quadro 1:

Quadro 1 – Divisão dos animais em grupos conforme cada método de controle utilizado

1.	Coorte de indivíduos com coleira impregnada com inseticida	Grupo C
2.	Coorte de indivíduos vacinados com vacina de subunidade	Grupo V1
3.	Coorte de indivíduos vacinados com vacina de subunidade e com coleira impregnada com inseticida	Grupo V1C
4.	Coorte de indivíduos vacinados com vacina recombinante	Grupo V2
5.	Coorte de indivíduos vacinados com vacina recombinante e com coleira impregnada com inseticida	Grupo V2C
6.	Coorte de indivíduos não vacinados e sem coleiras (Controle)	Grupo N

Número da coorte, método de controle e legenda atribuída ao grupo.

Na tabela 1, estão as informações sobre a composição de cada coorte, com a quantidade total de animais.

Tabela 1 - Número de cães selecionados para participar do estudo para avaliação de metodologias de controle de LV canina e sua classificação etária

Cães	Grupo C	Grupo V1	Grupo V1C	Grupo V2	Grupo V2C	Grupo N
Jovens	12	17	11	16	12	19
Adultos	42	48	47	48	45	49
Idosos	03	03	03	02	02	02
Total	57	68	61	66	59	70

Jovens até 1 ano; Adultos de 1 ano até 8 anos e idosos acima de 8 anos

Fonte: (LOPES, E. G., 2015)

Todos os animais participantes foram marcados com dispositivos eletrônicos (*chip*) para identificação (Animall Tag® Mascotes, Korth RFID Ltda.) e vermifugados conforme posologia indicada pelo fabricante do fármaco empregado (Vermivet® composto, Biovet SA).

A colheita de sangue foi feita de forma asséptica em duas alíquotas, sendo uma com adição e outra sem adição de anticoagulante (citrato de sódio). Em seguida o soro foi obtido a

partir da alíquota de sangue sem anticoagulante e transferido para tubos tipo *ependorf*, identificados e mantidos a -20°C até as análises, assim como as alíquotas de sangue total.

Foram colhidas amostras biológicas dos animais de todas as coortes em quatro instantes, no inquérito censitário, na formação da coorte ou dia zero, seis meses após o início do experimento e um ano após o início do experimento, como esquematizado no apêndice A. Todas as amostras biológicas dos animais foram estocadas e analisadas pelas provas de EIE-ELISA® e TR-DPP®.

Os protocolos de vacinação e uso de coleira foram aplicados exatamente como prescritos pelos fabricantes dos respectivos insumos.

Os animais que foram encoleirados (grupos C, V1C e V2C) foram revisitados além dos períodos acima, a cada quatro meses para troca das coleiras, como prescrito pelo fabricante. Da mesma forma, os animais vacinados (grupos V1, V1C, V2, V2C) foram abordados também para a aplicação da segunda e terceira doses das vacinas.

3.4 Provas Sorodiagnósticas

A definição para soropositividade foi feita exatamente como preconizado pelo protocolo oficial da rede pública de controle de zoonoses do município de Panorama, considerando-se animal infectado aquele positivo para o teste TR-DPP® e para o EIE-ELISA®. Na figura 4, estão demonstrados os resultados de não reagente e reagente do teste rápido (TR-DPP®).

Figura 4 – Demonstração dos resultados do teste rápido TR-DPP®

(A) Teste rápido TR-DPP® com resultado negativo com a linha rosa/roxa indicada no CONTROLE; Figura 4 (B). Teste rápido TR-DPP® com resultado positivo, com a linha rosa/roxa indicada no TESTE e no CONTROLE. Fonte: (LOPES E. G., 2015)

O EIE-ELISA® consiste na reação de anticorpos presentes no soro ou plasma de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Para validação do teste, é necessário calcular a média das densidades óticas (DO) dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Controle negativo deve ser $\geq 0,050$ $\leq 0,120$ de densidade ótica. E o controle positivo deve ser $\geq 0,500$ de DO. Para o cálculo do ponto de corte (*cut off*), soma-se as DO de três controles negativos dentro da faixa de validação e divide-se por 3. Depois multiplica-se por 2 o resultado. Se uma DO do controle negativo não estiver na faixa de validação, pode-se realizar o cálculo com duas DO do controle negativo. Para calcular a faixa cinza, utiliza-se o resultado do ponto de corte (*cut off*) e multiplica-se por 1,2. As amostras reagentes são as que apresentam densidade ótica igual ou superior ao *cut off*. As amostras não reagentes são as que apresentam densidade ótica inferior ao *cut off*. E as amostras indeterminadas são as que apresentam densidade ótica entre o *cut off* e a faixa cinza.

Os testes TR-DPP® e EIE-ELISA® foram realizados no laboratório de núcleo de parasitoses sistêmicas do Instituto Adolf Lutz (IAL) na cidade de São Paulo.

3.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi esquematizado em momentos relevantes do estudo de campo, sendo apresentados abaixo e no fluxograma (Apêndice A).

Tempo -1: os animais foram amostrados durante inquérito censitário e testados por TR-DPP®.

Tempo Zero: os animais revelados negativos pelo TR-DPP® durante o inquérito censitário foram revisitados em 48 horas para serem incluídos no estudo, para que fosse possível solicitar o consentimento do proprietário e para que fossem realizadas novas coletas de amostras. Nesse momento o animal recebeu sua intervenção conforme distribuição aleatória para participação como citado anteriormente.

Tempo 1: os animais são revisitados para a colheita de soro decorridos 6 meses do tempo zero.

Tempo 2: os animais são revisitados para colheita de soro decorridos 12 meses do tempo zero.

Outros tempos: os animais que receberam coleiras foram revisitados também a cada quatro meses, somente para troca de coleiras. Os animais que receberam vacinas foram revisitados, além dos tempos acima, em períodos necessários para proceder os reforços vacinais prescritos de acordo com a bula do fabricante. Nestas ocasiões, amostras biológicas não foram colhidas.

Como foi descrito, as coortes foram compostas somente por animais TR-DPP® negativos na ocasião do tempo -1. Porém, todos estes animais foram retestados no tempo zero tanto pela prova TR-DPP® quanto pela prova EIE-ELISA®. Somente os animais negativos por ambas as provas foram de fato incluídos nas análises de efetividade da medida de controle. Os demais foram excluídos das análises, embora tenham sido acompanhados nos tempos subsequentes da mesma forma que os soronegativos.

3.6 Estatística

Para os cálculos de efetividade das medidas de controle aplicada em cada coorte (EF) empregou-se a análise de risco relativo (RR) por meio de Regressão de Cox para riscos proporcionais (MORGENSTERN; KLEINBAUM; KUPPER, 1980), sendo $EF = 1 - RR$. A incidência foi calculada a partir da proporção do número de animais infectados pelo número de indivíduos amostrados, sendo que os cães que saíram entre 6 e 12 meses do experimento foram considerados como censura, sendo 0,5 amostra. A proteção foi calculada sendo 1-incidência. Também foi calculado o intervalo de confiança 95% de RR. Para análise dos resultados foram utilizadas planilhas eletrônicas Excel (2007), EPIINFO 6.04d e pelo *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 10.

4 RESULTADOS

No inquérito amostral foi realizada a coleta de 1077 amostras de sangue de cães domiciliados, o que corresponde a totalidade das residências dos setores 1, 2 e 3. O setor 4 foi parcialmente amostrado. Dentre estas amostras, 741 cães foram revelados soronegativos e 336 soropositivos pela prova de TR-DPP®. Este resultado indica uma prevalência da infecção em cães de aproximadamente 31,19%.

Nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 estão os resultados de provas sorodiagnostics para os animais das seis coortes.

Tabela 2 – Resultados sorodiagnostics nos animais do grupo C (coorte coleira)

Grupo C	Tempo -1^a	Tempo 0^b	Tempo 2^b
Perdidos	0	0	5
Soronegativos	57	45	36
Soropositivos	0	0	4
Excluídos	0	12 ^c	-
Analisados	57	45	40

(^a) Sorodiagnostics definido apenas por TR-DPP®

(^b) Sorodiagnostics definido por TR-DPP® e EIE-ELISA®

(^c) Cães EIE-ELISA® (+) TR-DPP® (-)

Tabela 3 – Resultados sorodiagnostics nos animais do grupo N (coorte controle)

Grupo N	Tempo -1^a	Tempo 0^b	Tempo 2^b
Perdidos	0	0	12
Soronegativos	70	58	38
Soropositivos	0	0	8
Excluídos	0	12 ^c	-
Analisados	70	58	46

(^a) Sorodiagnostics definido apenas por TR-DPP®

(^b) Sorodiagnostics definido por TR-DPP® e EIE-ELISA®

(^c) Cães EIE-ELISA® (+) TR-DPP® (-)

Tabela 4 – Resultados sorodiagnostics nos animais do grupo V1 (coorte vacina 1)

Grupo V1	Tempo -1^a	Tempo 0^b	Tempo 2^b
Perdidos	0	0	7
Soronegativos	68	49	39
Soropositivos	0	0	3
Excluídos	0	19 ^c	-
Analisados	68	49	42

^(a) Sorodiagnostics definido apenas por TR-DPP®

^(b) Sorodiagnostics definido por TR-DPP® e EIE-ELISA®

^(c) Cães EIE-ELISA® (+) TR-DPP® (-)

Tabela 5 – Resultados sorodiagnostics nos animais do grupo V1C (coorte vacina 1 com coleira)

Grupo V1C	Tempo -1^a	Tempo 0^b	Tempo 2^b
Perdidos	0	0	11
Soronegativos	61	48	35
Soropositivos	0	0	2
Excluídos	0	13 ^c	-
Analisados	61	48	37

^(a) Sorodiagnostics definido apenas por TR-DPP®

^(b) Sorodiagnostics definido por TR-DPP® e EIE-ELISA®

^(c) Cães EIE-ELISA® (+) TR-DPP® (-)

Tabela 6 – Resultados sorodiagnostics nos animais do grupo V2 (coorte vacina 2)

Grupo V2	Tempo -1^a	Tempo 0^b	Tempo 2^b
Perdidos	0	0	5
Soronegativos	66	52	42
Soropositivos	0	0	5
Excluídos	0	14 ^c	-
Analisados	66	52	47

^(a) Sorodiagnostics definido apenas por TR-DPP®

^(b) Sorodiagnostics definido por TR-DPP® e EIE-ELISA®

^(c) Cães EIE-ELISA® (+) TR-DPP® (-)

Tabela 7 – Resultados sorodiagnostics nos animais do grupo V2C (coorte vacina 2 com coleira)

Grupo V2C	Tempo -1^a	Tempo 0^b	Tempo 2^b
Perdidos	0	0	7
Soronegativos	59	44	27
Soropositivos	0	0	10
Excluídos	0	15 ^c	-
Analizados	59	44	37

^(a) Sorodiagnostics definido apenas por TR-DPP®

^(b) Sorodiagnostics definido por TR-DPP® e EIE-ELISA®

^(c) Cães EIE-ELISA® (+) TR-DPP® (-)

Na tabela 8 encontram-se os resultados obtidos das análises estatísticas de incidência, proteção, risco relativo e efetividade vacinal e de uso da coleira impregnada com deltametrina 4% e suas combinações para o controle da LV canina, conforme os resultados apresentados nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

Tabela 8 – Resultados das análises estatísticas para incidência, proteção, efetividade, risco relativo (RR) e intervalo de confiança do RR de todas as coortes

Coortes	Incidência	Proteção	Efetividade	Risco Relativo	Intervalo de confiança do Risco Relativo	
					Relativo	
					Inferior	Superior
Grupo C	10%	90%	38,2%	61,8%	0,181	2,113
Grupo V1	7,1%	92,9%	58,1%	41,9%	0,108	1,621
Grupo V1C	5,4%	94,6%	68,6%	31,4%	0,065	1,511
Grupo V2	10,6%	89,4%	35%	65%	0,206	2,049
Grupo V2C	21,6%	78,4%	-36,5%	136,5%	0,495	3,766
Grupo N	15%					

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho objetivou-se avaliar a efetividade de duas vacinas existentes no mercado assim como a coleira impregnada com deltamtrina 4%, como medidas de controle da LV canina, sendo usadas individualmente e/ou combinadas. Foi desenhado um estudo de campo com seis coortes na cidade de Panorama, região endêmica para a doença situada no extremo oeste do Estado de São Paulo. As seis coortes foram compostas por animais soronegativos, distribuídos pelo município aleatoriamente e foram submetidas a diferentes métodos de controle da leishmaniose visceral canina.

A grande diversidade genética dos parasitas, a dificuldade de identificar marcadores substitutos da resistência em hospedeiros imunizados naturalmente, e a falta de sistemas práticos de desafios que imitam a infecção natural, limitam o progresso no sentido de tornar as vacinas eficazes e universais. A pesquisa em vacinas caninas é ainda dificultada pela natureza polimórfica da infecção ("resistentes" versus padrões "sensíveis") e a evolução crônica da doença. Isto implica custos muito elevados para investigações de vacinas: de um lado, um elevado número de cães do estudo é necessário como muitos deles, de uma forma totalmente imprevisível, irá, naturalmente, resistir à infecção e, portanto, serão "inúteis" para a análise de dados; por outro lado, anos são necessários antes das avaliações sobre a eficácia clínica poder ser razoavelmente concluída. Ambos aspectos entram em conflito com as regras internacionais para bem-estar animal, tornando difícil a aprovação de protocolos de longo prazo, incluindo exames periódicos através de técnicas invasivas, tais como aspirado de tecido (GRANDONI, 2015).

As duas vacinas utilizadas nesse trabalho ainda estão em fase de estudo, e por esse motivo, a vacina comercializada pela Zoetis™ Brasil, Leishmune® teve sua licença de registro junto ao MAPA, suspensa em setembro de 2014 por não atender completamente os requisitos para os estudos de fase III, referente à avaliação da eficácia vacinal (BRASIL, 2014). Nos primeiros estudos de fase III da Leishmune®, Da Silva et al. (2001) descreveram que o grupo dos cães vacinados obteve 92% de proteção, onde apenas 8% desse grupo soroconverteu durante o período do estudo de dois anos. Já o grupo dos animais que receberam placebo, 33% tiveram o desenvolvimento de sinais clínicos e/ou morte em decorrência da doença. Em um segundo estudo realizado por Borja-Cabrera et al. (2002)

durante um período de dois anos, a vacina mostrou uma proteção de 95% e uma eficácia de 80%. Onde 8/33 (25%) do grupo controle e 1/20 (5%) do grupo vacinados morreram por leishmaniose. Os autores ainda concluíram que a proteção tem em média duração de 3,5 anos nos cães e que foi concomitantemente associada com a redução de incidência de casos humanos na região do estudo. Acreditam ainda que a vacina produz um efeito imunoterapêutico quando administrado em animais infectados por *L. donovani* ou *L. chagasi* enquanto eles ainda estavam assintomáticos (BORJA-CABRERA et al., 2004). Outra particularidade relacionada a vacina Leishmune® é a indistinção de um animal vacinado de um animal naturalmente infectado por até 180 dias após a vacinação, pelos testes diagnósticos oficiais adotados pelo Ministério da Saúde, TR-DPP® e ELISA® (MARCONDES et al., 2013). Em contrapartida os resultados encontrados por Palatnik-de-Sousa (2009) em um estudo realizado em campanha de controle sorológico de áreas endêmicas, apenas 76 dos 5.860 (1,3%) cães vacinados com Leishmune® apresentaram positividade no teste preconizado pelo MS, utilizado em inquérito epidemiológico no Brasil.

No presente estudo, os resultados obtidos no grupo (V1) vacina Leishmune®, indicou que nesse grupo a incidência foi 7,1% e que a vacina teve uma proteção de 92,90% e quando comparado ao grupo controle (N), sua efetividade foi de 59,35%. Esse dado é menor comparado aos encontrados em trabalhos realizados por Borja-cabrera et al. (2004), porém nos mostra que existe algum efeito protetor.

No grupo que a vacina Leishmune® foi combinada com a coleira Scalibor® (V1C) esse cenário se repete, mas com uma efetividade maior. A incidência nesse grupo foi de 5,4%, proteção de 94,6% e efetividade de 63,96%. A coleira por começar a agir logo após a colocação e chegando ao seu efeito máximo em até três semanas, garante uma proteção melhor ao animal exposto. O animal vacinado de acordo com os dados do fabricante só ficará imunizado após o vigésimo primeiro dia da terceira dose. Ou seja o animal fica desprotegido aproximadamente três meses. Nesse caso a coleira usada juntamente com a vacina melhorou a efetividade da vacina quando usada sozinha.

A segunda vacina avaliada nesse estudo, a Leish-Tec®, produzida pela Hertape Calier SA, apresentou resultados referentes aos estudos de fase III, no trabalho realizado em Porteirinha, Estado de Minas Gerais durante os anos 2008 e 2010. Foi relatado que a prevalência inicial na cidade era de 33,93% e após os 24 meses da pesquisa a incidência foi de 12,5% nos animais do grupo controle. Observaram também que somente 3,59% dos cães vacinados não responderam a vacina, apresentando 96,41% de proteção contra a LV canina no grupo de animais vacinados. A eficácia vacinal observada quando comparada com a do grupo

controle foi de 71%. No grupo de cães vacinados que produziram anticorpos anti-A2, a transmissibilidade foi reduzida em 40%, quando comparado com o grupo controle, o que demonstrou que a vacina reduziu a capacidade de transmissão do animal vacinado e infectado para o vetor (FERNANDES et al., 2012). No presente estudo, os resultados obtidos do grupo (V2) coorte de animais vacinados com Leish-Tec®, também foram menores que os estudos realizados por Fernandes et al. (2012). A incidência foi de 10,6%, proteção de 89,4% e comparado ao grupo controle a efetividade foi de 33,33%. Ao associarmos a vacina Leish-Tec® com a coleira, grupo (V2C) obtivemos valores de efetividade ainda piores. Em teoria, espera-se que ao se associar dois métodos de controle, a efetividade deve ser maior que a efetividade de cada método individualmente. Porém no presente estudo, esse grupo teve uma incidência de 21,6% (maior do que no grupo controle), proteção de 78,4% e quando comparado ao grupo controle (N) a efetividade foi de -36,5%. Esse dado gerado, por ter sido tão discordante, classificamos como uma flutuação estatística.

Outro fator que pode explicar esse resultado foi a prevalência usada para os cálculos estatísticos realizados no início do trabalho que definiu o tamanho das coortes. Utilizamos uma prevalência de 40% da doença na cidade (BORTOLETTO, 2011). Também podemos justificar esse dado obtido pelo tempo de observação das coortes, que poderia ser maior do que 12 meses.

Outro método de controle estudado refere-se ao emprego de coleiras impregnadas com inseticida (deltametrina 4%), no caso a coleira Scalibor® produzida pela MSD Saúde Animal. Em vários trabalhos realizados com a utilização da coleira, esta mostrou resultados satisfatórios, com redução das taxas de alimentação sanguínea e efeito letal para as diferentes espécies de flebotomíneos (KILLICK- KENDRICK et al., 1997; DAVID et al., 2001; MAROLI et al., 2001; GAVGANI et al., 2002; REITHINGER et al., 2004). Em um estudo realizado no Estado de Minas Gerais, observou reduções de 50% nas razões de odds para soroconversão para *Leishmania* spp. em coortes de cães com coleira (n=136) e sem coleira (n=97) (REITHINGER et al., 2004). Na Itália, outro trabalho demonstrou que o risco de infecção na população não exposta foi reduzido em 84%, os autores estudaram o uso de coleira e uso de medicação inseticida em formulação *spot-on*, em duas coortes distintas n=120 e n=119, respectivamente. A taxa de redução de risco foi a mesma (FERROGLIO et al., 2007). Este tipo de intervenção demonstrou-se razoavelmente bem sucedido também em uma região no Irã, onde os autores verificaram que cães com coleiras impregnadas estiveram sob menor risco de soroconversão para infecção por *Leishmania* spp. Neste caso, foi possível verificar uma redução significativa também na incidência da leishmaniose em crianças nas

vilas que os cães foram tratados. Esta redução presumivelmente pode ser devida não só a diminuição do repasto de insetos em decorrência do poder repelente da coleira como também ao aumento da mortalidade dos vetores (GAVGANI et al., 2002). No município de Andradina, SP foi feito um estudo de coorte no período de 2002 a 2004, para avaliação da efetividade da coleira impregnada com inseticida (deltametrina 4%) para o controle da doença. Foram encoleirados todos os cães negativos no inquérito sorológico anteriormente realizado, sendo todos domiciliados e cadastrados. Eles observaram uma diminuição no número de casos e no coeficiente de incidência em humanos, registraram apenas 2 casos e uma incidência de 3,6 casos/100.000 habitantes. Observaram também uma diminuição na prevalência canina, sendo inferior a 5% no final do estudo (CAMARGO-NEVES et al., 2004b). No presente estudo, a incidência no grupo que utilizou a coleira foi de 10%, conferindo uma proteção 90% e, quando comparado ao grupo controle (N), a efetividade da coleira foi de 38,2%. Esses resultados revelam uma efetividade menor comparado aos outros trabalhos citados.

Vários fatores podem estar colaborando para os resultados de efetividade obtidos nas coortes estudadas. Os valores de desempenho de medidas de controle apresentaram-se sem significância estatística, a julgar pelos intervalos de confiança obtidos para as medidas de risco relativo.

Algumas razões atinentes ao desenho amostral podem estar relacionadas a estas não significâncias estatísticas. Em primeiro, a prevalência da área estudada foi estimada com um valor superior ao observado durante o período estudado. Esta estimativa foi feita com base nos estudos de Bortoletto (2011), onde os valores de prevalência foram definidos em 40%. Para contornar os efeitos desta superestimativa, o estudo presente deveria ter sido prolongado por um período superior a 12 meses. Entretanto, o tamanho das coortes, neste caso deveria ser aumentado consideravelmente. Ainda, as perdas de animais ao longo do experimento foram muito acima do esperado, o que pode ser explicado pela condição cultural da população local. Um trabalho desta natureza deveria, então, considerar que um número expressivo de animais pode ser perdido em razão de características intrínsecas das comunidades abordadas.

Uma segunda razão é relacionada à estimativa das proteções das medidas de controle empregadas. Os valores desses parâmetros podem de fato estarem aquém daqueles informados pela literatura científica ou pelas informações fornecidas pelo fabricante.

Finalmente, este estudo foi realizado totalmente baseado em métodos diagnósticos utilizados pela rede oficial, os testes sorodiagnostics TR-DPP® e EIE-ELISA®. São estes os

testes diagnósticos que são preconizados pela rede oficial e que estariam atualmente disponíveis para monitorização das estratégias de controle ora utilizadas.

Nesse sentido, situação ainda menos favorável às medidas de controle poderiam ser encontradas se técnicas com melhor acurácia diagnóstica tivessem sido empregadas para o diagnóstico de infecções por *Leishmania* spp.

6 CONCLUSÕES

- Dos 381 animais que iniciaram a pesquisa, 34,6% (132) foram perdidos por motivos, como morte, mudança de endereço, fugas, desistência da participação pelo proprietário, entre outros.
- A efetividade encontrada ao final de 12 meses de observação para os grupos C, V1, V2, V1C e V2C foram 38,2%, 58,1%, 35%, 68,6% e -36,5% respectivamente com base nos cálculos estatísticos feitos por Regressão de Cox para riscos proporcionais.
- Embora a estratégia de controle empregada nos grupo C, V1, V2, V1C tenha desempenhando alguma efetividade, os resultados dos intervalos de confiança do risco relativo (RR) feitos para validação dos resultados, não foram significativos quando comparados ao grupo controle (N).
- O grupo V2C foi classificado como uma flutuação estatística devido ao seu resultado discrepante.
- A superestimativa do valor de prevalência considerada na cidade antes do início da pesquisa, valor esse utilizado como base de cálculos para o delineamento experimental e considerando também a numerosa perda de animais durante a pesquisa, concluímos que o tamanho das coortes e o tempo previsto para observação não foram suficientes para gerar um resultado estatisticamente significativo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUZA ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, n. 1-2, p. 151-158, 2005.
- ANDRADE DE, H. M.; REIS, A. B.; DOS SANTOS, S. L.; VOLPINI, A. C.; MARQUES, M. J.; ROMANHA, A. J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 231-238, 2006.
- ARAÚJO, M. S.; ANDRADE, R. A.; SATHLER-AVELAR, R.; MAGALHÃES, C. P.; CARVALHO, A. T.; ANDRADE, M. C.; CAMPOLINA, S. S.; MELLO, M. N.; VIANNA, L. R.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; MALAQUIAS, L. C.; ROCHA, L. M.; MARTINS-FILHO, O. A. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 141, n. 1-2, p. 64-75, 2011.
- ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmanioses – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.
- BIO-MANGUINHOS. Instituto de tecnologia em imunodiagnósticos. **TR DPP® leishmaniose visceral canina. Teste rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania***. Rio de Janeiro: BIO-MANGUINHOS 2011.
- BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DA SILVA, V. O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W. R.; GOMES, E. M.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante). **Vaccine**, v. 20, n. 27-28, p. 3277-3284, 2002.
- BORJA-CABRERA, G. P.; CRUZ MENDES, A.; PARAGUAI DE SOUZA, W.; HASHIMOTO OKADA, L. Y.; DE A. TRIVELATO, F. A.; KAWASWIKI, J. K. A.; COSTA, A. C.; REIS, A. B.; GENARO, O.; BATISTA, L. M.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUZA, C. B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v. 22, n. 17-18, p. 2234-2243, 2004.
- BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; BAUER, F. S.; PARRA, L. E.; MENZ, I.; MORGADO, A. A.; SOARES, I. S.; BATISTA, L. M.; PALATNIK DE SOUZA, C. B. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v. 26, n. 39, p. 4991-4997, 2008.

BORTOLETTO, D. V. **Influencia da esterilização cirurgica na população canina de área endêmica para Leishmaniose Visceral**. 2011. p. 38 Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho, Araçatuba.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância sanitária em Saúde. Departamento de vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância sanitária em Saúde. Departamento de vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007a, 182 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ministério da Saúde. Gabinete do ministro. Instrução Normativa Interministerial n.31 de 9 de julho de 2007. **Diário Oficial [da] União**. Brasília, DF, 10 jul. 2007b. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância das doenças transmissíveis. **Nota Técnica Conjunta nº 01/2011 CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina LVC. Brasília, DF, 29 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários. **Nota Técnica nº 038/2014/DFIP/DAS**. Suspensão da licença de fabricação e comercialização do produto Leishmune®. Brasília, DF, 11 nov. 2014.

BULLE, B.; MILLON, L.; BART, J. M.; GALLEGU, M.; GAMBARELLI, F.; PORTUS, M. Practical approach for typing strains of *leishmania infantum* by microsatellites analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3391-3397, 2002.

CAMARGO-NEVES, V. L.; GOMES, A. C.; ANTUNES, J. L. F. Correlação da presença de flebotomíneos com registros de casos da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 299-306, 2002.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. de. **Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo, Brasil**. 2004. 225 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004a.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. DE, RODAS, L. A. C., & PAULIQUÉVIS JUNIOR, C. Avaliação da efetividade da utilização das coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para o controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)** v.12, n. 7-14, p. 7-14, 2004b.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. Grupo de estudos em Leishmanioses. Classificação epidemiológica dos municípios para leishmaniose visceral americana. **Boletim Epidemiológico Paulista, (BEPA)** v. 4, n. 39, p. 27-39, 2007.

CARDOSO, L.; SCHALLIG, H. D. F. H.; CORDEIRO DA SILVA, A.; CABRAL, M.; ALUNDA, J. N. M.; RODRIGUES, M. Anti-leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, n. 1-2, p. 35-41, 2007.

CARVALHO, F. A.; CHAREST, H.; TAVARES, C. A.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E. P.; RABELLO, A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n. 4, p. 289-295, 2002.

CHARREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 5, p.2975-2984, 1994.

COELHO, E. A. F.; TAVARES, C. A. T.; CARVALHO, F. A. A.; CHAVES, K. F.; TEIXEIRA, K. N.; RODRIGUES, R. C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988–3994, 2003.

COLLIN, N.; GOMES, R.; TEIXEIRA, C. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 5, p.1-11, 2009.

COLOMBO, F. A.; ODORIZZI, R. M. F. N.; LAURENTI, M. D.; GALATI, E. a B.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology research**, v. 109, n. 2, p. 267–74, 2011.

CORTES, S.; MAURICIO, I.; ALMEIDA, A.; CRISTOVÃO, J. M.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; CAMPINO, L. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. **Parasitology International**. v. 55, n. 4, p. 277-283, 2006.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMANDA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. specific kinetoplastid *primers*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2004.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

COSTA, C. H. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2959-2963, 2008.

COSTA, C. H. N.; PETERS, N. C.; MARUYAMA, S. R.; BRITO, E. C. de; SANTOS, I. K. F. D. M. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. **Public Library of Science: Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e943, 2011.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; MARIA, M. D.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Ascar: Ixodidae) in the epidemiology of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1-2, p. 149-155, 2005.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, 2002.

CVE, Comitê de Leishmaniose Visceral Americana da Secretaria do Estado de São Paulo. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo , atualizado em novembro de 2011. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPa)**, v. 8, n. 96, p. 32–36, 2011.

DA SILVA, V. O.; BORJA-CABRERA, G. P.; PONTES, N. N. C.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUZA, C. B. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). **Vaccine**, v. 19, n. 9-10, p. 1082-1092, 2001.

DA SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PACHECO, R. S.; BRASIL, R. P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 2, p. 251-257, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.140, n. 1-2, p. 54-60, 2006.

DAVID, J. R.; STAMM, L. M.; BEZERRA, H. S.; SOUZA, R. N.; KILLICK-KENDRICK, R.; LIMA, J. W. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 839-847, 2001.

DE AMORIM, I. F. G.; FREITAS, E.; ALVES, C. F.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; COSTA-VAL, A. P. Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune® vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 55-63, 2010.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPEBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*- a mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DIETZE, R.; BAPTISTA BARROS, G.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, v. 25, n. 5, p. 1240-1242, 1997.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, ano 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M. S.; COELHO, E. A. F.; MICHALICK, M. S. M.; FREITAS, E.; DE MELO, M. N.; TAFURI, L. W.; RESENDE, M.; HERMONT, V.; ABRANTES, F.; GRAZZINELLI, R. T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

FERNANDES, A. P.; COELHO, E. A. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; GRIMALDI JUNIOR, G.; GAZZINELLI, R. T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 476-485, 2012.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis: an update. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain. **Proceedings...** Ed. Wiesbaden: Hoechst Roussel Vet, 1999. p. 6-10.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2. ed. Rio Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001. p. 255-262.

FERROGLIO, E.; CENTARO, E.; MIGNONE, W.; TRISCIUOGLIO, A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 162-166, 2007.

FOGLIA MANZILLO, V.; OLIVA, G.; PAGANO, A.; MANNA, L.; MAROLI, M.; GRADONI, L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1-2, p. 142-145, 2006.

FOROUGH-IPARVAR, F.; HATAM, G. Vaccines for Canine Leishmaniasis. **Advances in Preventive Medicine**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; COSTA, R. T.; MONTEIRO, E. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VIEIRA, E. P.; PRATA, A.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; FORTE-DIAS, C. L.; SILVA, J. C.; DIAS, E. S. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 213-220, 2005.

FREITAS, E.; MEOL, M. N.; COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. M. Transmission of *leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, 2006.

GAVGANI, A. S.; HODJATI, M. H.; MOHITE, H.; DAVIES, C. R. Effect of insecticide impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. **Lancet**, v. 360, n. 9330, p. 374-379, 2002.

- GHEDIN, E.; ZHANG, W. W.; CHAREST, H.; SUNDAR, S.; KENNEY, R. T.; MATLASHEWSKI, G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 5, p. 530-535, 1997.
- GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; TEIXEIRA, M.J. Immunity to a salivary protein of a sandfly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.105, n.22, p.7845–7850, 2008.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
- GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Veterinary Parasitology**, v.100, n. 1-2, p.87–103, 2001.
- GRADONI, L. Canine leishmania vaccines: Still A long way to go. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n.1-2, p. 94–100, 2015.
- GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 685-698.
- GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELART, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.
- HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, n. 7, p.1989-1995, 1998.
- KILLICK- KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M. P.; CADIERGUES, M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, n. 2, p. 105–111, 1997.
- KUHLS, K.; MAURICIO, I. L.; PRATLONG, F.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 11-12, p. 1224-1234, 2005.
- LACERDA, M. M. The brazilian Leishmaniasis control program. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 489-495, 1994.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature: Reply. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 118, 2006.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. American visceral leishmaniasis, on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 81, n. 3, p. 517, 1987.

LANGONI, H.; LUCHEIS, S. B.; DA SILVA, R. C.; CASTRO, A. P. B.; PAES, A. C. American visceral leishmaniasis: A case report. **Journal Venomous Animal and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 361-372, 2005.

LEAL, C. R. B. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v.6, n.69, p. 14–18, 2009.

LEISHMUNE. **Manual técnico de Leishmaniose visceral canina**. Campinas: Fort Dodge®, 2004. 52p.

LEMESRE, J. L.; HOLZMULLER, P.; GONÇALVES, R. B.; BOURDOISEAU, G.; HUGNET, C.; CAVALEYRA, M.; PAPIEROK, G. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomized efficacy field trial. **Vaccine**, v. 25, n. 21, p. 4223–4234, 2007.

MAHBOUDI, F.; ABOLHASSANNI, M.; TEHRANI, S. R.; AZIMI, M. Differentiation of old and new world *Leishmania* species at complex and species levels by PCR. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 34, n. 10, p. 756-758, 2002.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 13-30.

MARCONDES, M.; DE LIMA, V. M. F.; DE ARAÚJO, M. D. F. L.; HIRAMOTO, R. M.; TOLEZANO, J. E.; VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 649-652, 2013.

MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C. L.; BECK, H. P.; FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3147-3153, 2003.

MAROLI, M.; MIZZON, V.; SIRAGUSA, C.; D'OORAZI, A.; GRADONI, L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. **Journal of Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, n. 4, p. 358- 363, 2001.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 237-246, 1999.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. **Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 263-267, 2004.

MENDES, C. O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA-CABRERA, G. P.; MELO BATISTA, L. M.; SANTOS, M. A.; PARRA, L. E.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 20, n. 19-20, p. 2589-2597, 2003.

MILLES, M. A.; VEXENAT, J. A.; CAMPO, J. H. F.; CASTRO, J. A. F. Canine Leishmaniasis in Latin América: control strategies for visceral Leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS, 1999, Barcelona, Spain. **Proceedings...** Barcelona, Spain. R. Killick-Kendrick, Wiesbaden: Hoeschst Roussel Veterinary, 1999. p. 46-53.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

MORENO, J.; VOULDOUKIS, I.; MARTIN, V.; MCGAHIE, D.; CUISINIER, A.; GUEGUEN, S. Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n.6, p. e1683, 2012.

MORGENSTERN, H.; KLEINBAUM, D. G.; KUPPER, L. L. Measures of Disease Incidence Used in Epidemiologic Research. **International Journal of Epidemiology**, v. 9, n. 1, p. 97-104, 1980.

NASEREDDIN, A.; EREGAT, S.; AZMI, K.; BANETH, G.; JAFFE, C. L.; ABDEEN, Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 178-183, 2006.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1265-1266.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 31-72.

NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA, M. A. B.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; MENZ, I.; PARRA, L. E.; XU, Z.; CHU, H. J.; PALATNIK DE SOUZA, C. B.; LUVIZOTTO, M. C. R. Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, v. 23, n. 40, p. 4805-4810, 2005.

NOYES, H. A.; REYBURN, H.; BAILEY, J. W.; SMITH, D. A nested-PCR-based schizont method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2877-2881, 1998.

NUNES, C. M.; PIRES, M. M.; DA SILVA, K. M.; ASSIS, F. D.; GONÇALVES FILHO, J.; PERRI, S. H. V. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 131-133, 2010.

- PALATNIK, C. B.; BOROJEVIC, R.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 3, p. 754-763, 1989.
- PALATNIK DE SOUZA, C. B.; DUTRA, H. S.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the Fucose-Mannose Ligand (FML). **Acta Tropica**, v. 53, n. 1, p. 59-72, 1993.
- PALATNIK DE SOUZA, C. B.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; GOMES, E. M.; BOROJEVIC, R. Experimental murine *Leishmania donovani* infection immunoprotection by the Fucose Mannose Ligand (FML). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 2, p. 547-551, 1994a.
- PALATNIK DE SOUZA, C. B.; MORENO, M. B.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BOROJEVIC, R. The FML vaccine (Fucose-Mannose Ligand) protects hamsters from experimental Kala-Azar. **Ciência e Cultura**, v. 46, n. 4, p.290-296, 1994b.
- PALATNIK DE SOUZA, C. B.; GOMES, E. M.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; LUZ, K.; PALATNIK, M.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 4, p. 390-393, 1995.
- PALATNIK DE SOUZA, C. B.; GOMES, E. M.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W. R.; MACEDO, S. R.; MEDEIROS, L. V.; LUZ, K. G. The FML (fucose mannose ligand) of *Leishmania donovani*. A new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human Kala-Azar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 2, p. 153-163, 1996.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, v.26, n.14, p.1709–1724, 2008
- PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SILVA-ANTUNES, I.; MORGADO, A.A.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; LAVOR, C. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas. **Vaccine**, v. 27, n. 27, p. 3505–3512, 2009.
- PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E. G.; MEIRO, M. C. B. F.; OLIVEIRA, G. G. S.; SANTOS, W. L. C.; PONTES DE CARVALHO, L.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis implication for the disease control. **Acta Tropica**, v. 69, n. 1, p. 75-83, 1998.
- PARRA, L. E.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; SOUZA, L. O. P.; PALATNIK DE SOUZA, C. B.; MENZ, I. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2180-2186, 2006.
- PENNACCHI, M.; RENDA, P. Leishmaniose: cada vez mais na cidade. **Cães e Cia**, v. 22, n. 248, p. 42- 2000.

- PENNISI, M. G.; REALE, S.; LO GIUDICE, S.; MASUCCI, M.; CARACAPPA, S. VITALE, M.; VITALE, F. Real-time PCR in dogs treated for Leishmaniasis with Allopurinol. **Veterinary Research Communications**, v. 20, n. 2, p. 301-303, 2005.
- PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa e Controle da LVA no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 6, n. 68, p. 4-13, 2009.
- RAMOS, G. P.; FILHO, F. B. R.; BOTELHO, G. G.; VOGEL, J. Valores bioquímico-séricos de cães portadores de leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 16, n. 5, p. 192-195, 1994.
- RANDOLPH, S. E. To what has climate change contributed to the recent epidemiology of tick-borne diseases? **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 92-94, 2010.
- RANGEL, O.; HIRAMOTO, R. M.; HENRIQUES, L. F.; TANIGUCHI, H. H.; CIARAVOLO, R. M. C.; TOLEZANO, J. E.; FRANÇA, A. C. C.; YAMASHIRO, J.; OLIVEIRA, S. S. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, para 2013. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPa)**, v. 10, n. 111, p. 3-14, 2013.
- REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 37, p. 2931-2935, 1999.
- REITHINGER, R.; COLEMAN, P. G.; ALEXANDER, B.; VIEIRA, E. P.; ASSIS, G.; DAVIES, C. R. Are insecticide impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal of Parasitology**, v. 34, n. 1, p. 55-62, 2004.
- REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2001. p. 214-266.
- RIBEIRO, V. Leishmaniose: sorologia vs imunização. Posso tratar cães? In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 5. 2005, São Paulo. **Anais....**, São Paulo: ANCLIVEPA, 2005.
- RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.
- ROSA, I. C. O. S.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: uma breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. 2, n. 11, p. 24-27, 1997.
- SANTOS, W. R.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUZA, C. B. Vaccination with FML antigen (Fucose Mannose Ligand) of the *Leishmania donovani* in the Swiss Albino model. **Vaccine**, v. 17, p. 2554-2561, 1999.
- SANTOS, W. R.; DE LIMA, V. M. F.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BERNARDO, R. R.; PALATNIK DE SOUZA, C. B. Saponins, IL 12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, p. 30-43, 2002.

SANTOS, F. M.; BORJA-CABRERA, G. P.; MIYASHIRO, L. M.; GRECHI, J.; REIS, A. B.; MOREIRA, M. A. B.; MARTINS FILHO, O. A.; LUVIZOTTO, M. C.; PESSÔA, L. M.; GONÇALVES, P. R.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune® vaccine. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6176-6190, 2007.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo**. São Paulo: SES, 2006. 160p.

SARAIVA, E. M.; BARBOS, A. de F.; SANTOS, F. N.; BORJA-CABRERA, G. P.; NICO, D.; SOUZA, L. O. P.; MENDES-AGUIAR, C. O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; FAMPA, P.; PARRA, L. E.; MENZ, I.; DIAS JR, J. G.; OLIVEIRA, S. M.; PALATNIK-DE-SOUZA, C. The FML-vaccine (Leishmune®) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. **Vaccine**, v. 24, n. 13, p. 2423-2431, 2006.

SENIOR, K. Vector-borne diseases threaten Europe. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 531-532, 2008.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 577-579, 2006.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JUNIOR, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 511, 1984.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

SCHÖNIAN, G.; MAURICIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? **Trends in Parasitology**, v. 26, n.10, p. 466-469, 2010.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 311-330. 2006.

ULIANA, S. R. B.; NELSON, K.; BERVERLEY, S. M.; CAMARGO, E. P.; FLOETER-WINTER, L. M. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 324-330, 1994.

VAN EYS, G. J.; SCHOONE, G. J.; KROON, N.; EBELING, S. B. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *leishmania* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 133-142, 1992.

VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; LE RAY, D.; JACQUET, D.; VERVOORT, T. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. **The Veterinary Record**, v. 141, n. 13, p. 328-330, 1997.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) brasiliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 31-37, 2004.

WHO, W. H. O. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases 2013. **Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases**, v. 3.9, p. 67–71, 2013.

ZANIN F. H.; COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; MARQUES-SILVA, E. A.; SILVACOSTA, M. M.; REZENDE, S. A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 9, p. 1070-1077, 2007.

Apêndice A – Fluxograma do experimento

Fonte: (LOPES, E. G., 2015)

Apêndice B – Lista dos animais participantes na pesquisa.

									Tempo Zero		Tempo 1		Tempo 2	
	Coorte	Nº	Nome	RA	Setor	CHIP	Sexo	Idade	TR-DPP®	EIE-ELISA®	TR-DPP®	EIE-ELISA®	TR-DPP®	EIE-ELISA®
1	C	1	Negona	11800	1	4077	F	A	1	1	1	1	1	1
2	C	2	Max	11248	1	4078	M	J	1	1	1	1	1	1
3	C	17	Duda	12209	1	4292	F	J	1	1	1	1	1	1
4	C	21	Mel	12341	1	4086	F	A	1	1	1	1	1	1
5	C	24	Pandora	7845	1	4083	F	A	1	2	1	1	1	CINZA
6	C	37	Miucha	11667	2	4118	F	A	1	1	1	1	1	1
7	C	44	Bob	12244	2	4311	M	J	1	1	1	1	1	1
8	C	57	Neguinha	11676	2	2875	F	A	1	1	1	1	1	1
9	C	69	Nina	12277	2	2712	F	A	1	1	1	1	1	1
10	C	77	Meg	9889	2	2701	F	A	1	1	1	1	1	1
11	C	84	Pakita	10037	2	2711	F	A	1	1	1	1	1	1
12	C	96	Cravinho	12411	2	0793	M	A	1	1	1	1	1	1
13	C	106	Bethoven	10149	2	0785	M	A	1	2	1	1	1	1
14	C	119	Hercules	12442	2	0810	M	A	2	1	1	1	1	1
15	C	142	Luluzinha	10779	3	1062	F	A	1	1	1	1	1	1
16	C	152	Bob	10758	3	0826	M	A	1	2	1	2	1	2
17	C	160	Trovão	12713	3	1067	M	A	1	1	1	1	1	1
18	C	169	Pingo	10772	3	0817	M	A	1	1	1	1	1	1
19	C	173	Mel	12710	3	0814	F	A	1	2	1	2	1	2
20	C	175	Negão	12707	3	0813	M	A	1	2	1	1	1	2
21	C	187	Lili	12795	3	0741	F	A	1	2	1	1	2	1
22	C	199	Melissa	12818	3	0743	F	A	1	1	1	1	1	1
23	C	203	Nina	7509	3	0628	F	A	1	1	1	1	1	1
24	C	205	Branquinha	12788	3	0737	F	A	1	1	1	1	1	1
25	C	209	Zuki	12792	3	0601	M	I	1	1	1	1	1	1
26	C	211	Lica	12805	3	0627	F	A	1	1	1	1	1	1
27	C	218	Jhulio	12813	3	0612	M	A	1	1	1	1	1	1
28	C	221	Maike	12772	3	0610	M	A	1	1	1	1	1	1
29	C	245	Sandy	3652	3	0623	F	I	1	1	1	1	1	1
30	C	261	Scooby	12843	3	0685	M	J	1	1	1	1	1	1
31	C	263	Meg	12841	3	5397	F	A	1	1	1	1	1	1
32	C	277	Corta Vento	12882	3	0692	M	A	1	1	1	1	1	1
33	C	288	Belinha	12913	3	5376	F	A	1	1	2	1	2	1
34	C	291	Lili	12901	3	0874	F	A	1	1	1	2	1	CINZA
35	C	298	Tilica	12959	4	0707	F	J	1	2	1	1	1	1
36	C	300	Leão	12940	4	0711	M	J	1	1	1	1	1	1
37	C	320	Melody	12904	3	0703	F	J	1	1	1	1	1	1
38	C	330	Bilu	12990	4	0702	M	A	1	1	1	1	1	1

39	C	340	Mel	13009	4	0674	F	A	1	1	1	1	1	1
40	C	350	Spike	9164	4	0751	M	A	1	1	1	1	1	1
41	C	353	Tuti	9162	4	0862	F	A	1	1	1	2	1	1
42	C	357	Xena	4472	4	0776	F	A	1	2	1	1	1	1
43	C	360	Breno	7687	4	0758	M	A	1	CINZA	1	1	2	2
44	C	363	Bethoven	10546	4	0763	M	A	2	1	1	2	1	1
45	C	364	Bec	13040	4	847	M	A	1	1	2	1	2	2
46	C	22	Belisco	12222	1	4081	M	A	1	1	2	2	-	-
47	C	49	Pelum	12252	2	2878	M	J	1	1	-	-	-	-
48	C	62	Lion	12268	2	2880	M	A	1	1	1	1	-	-
49	C	80	Dara	12374	2	2702	F	J	1	1	2	2	-	-
50	C	126	Sisco	12559	3	1051	M	J	1	1	-	-	-	-
51	C	143	Boby	12657	3	1074	M	J	1	1	-	-	-	-
52	C	166	Neguinha	12623	3	811	F	A	1	2	-	-	-	-
53	C	236	Maguila	3626	3	683	M	I	1	1	-	-	-	-
54	C	241	Lilica	12825	3	0733	F	A	1	1	1	1	-	-
55	C	262	Lassie	12842	3	0684	F	A	1	1	-	-	-	-
56	C	309	Prata	12948	4	0886	F	J	1	1	1	1	-	-
57	C	333	Dolly	12945	4	0897	M	A	1	1	2	2	-	-
58	N	8	Branco	9942	1	4291	M	A	1	1	1	1	1	1
59	N	23	Xuxa	12223	1	4129	F	J	1	1	1	1	1	1
60	N	30	Max	11668	1	4073	M	A	1	1	1	1	1	1
61	N	33	Xuxa	11662	2	4115	F	A	1	1	1	1	1	1
62	N	43	Neguinho	12243	2	4123	M	I	1	1	1	1	1	1
63	N	53	Nica	9869	2	2877	F	A	1	2	1	1	1	1
64	N	70	Neguinho	12275	2	2727	M	A	1	1	1	1	1	1
65	N	86	Rafer	10109	2	2713	M	A	1	1	1	1	1	1
66	N	89	Babaloo	12389	2	2719	F	A	1	2	1	1	1	2
67	N	94	Lilica	12384	2	2710	F	J	1	1	1	1	2	1
68	N	104	Laisa	12420	2	2721	F	J	1	1	1	1	1	1
69	N	109	Belinha	12423	2	808	F	A	1	1	1	1	1	1
70	N	111	Mel	12425	2	783	F	A	1	1	1	1	1	1
71	N	122	Pantera	10054	2	790	F	I	1	1	1	1	1	1
72	N	134	Tales	12640	3	1054	M	A	1	2	2	2	2	2
73	N	155	Pingo	12715	3	1068	M	J	1	1	1	1	2	2
74	N	161	Leão	10746	3	1056	M	A	1	1	1	1	2	2
75	N	164	Duque	12564	3	1057	M	A	1	1	1	1	1	1
76	N	171	Lilica	12575	3	825	F	J	1	1	1	1	1	1
77	N	182	Dido	9107	3	839	M	A	1	1	1	1	1	1
78	N	198	Rabito	12821	3	833	M	A	1	2	1	2	1	1
79	N	210	Bethoven	12793	3	603	M	A	1	1	1	1	1	1
80	N	212	Neguinho	12807	3	608	M	A	1	1	1	1	1	1
81	N	215	Habi	12797	3	617	M	A	1	1	1	1	1	1
82	N	219	Titica	12773	3	739	F	A	1	1	1	1	1	1
83	N	233	Belinha	12832	3	686	F	A	1	1	2	1	1	2
84	N	244	Belinha	12829	3	732	F	A	1	1	1	1	1	1

85	N	252	Pan	12872	3	709	F	A	1	1	1	1	1	1
86	N	264	Bob	10656	3	690	M	A	1	2	1	2	2	2
87	N	273	Pitchulinha	12883	3	900	F	A	1	2	1	1	1	1
88	N	274	Diana	12857	3	5390	F	A	1	1	1	1	1	1
89	N	275	Neguinho	12862	3	881	M	A	1	1	1	2	1	2
90	N	283	Lassie	12889	3	877	F	J	1	1	1	1	1	1
91	N	287	Susi	12919	3	680	F	A	1	1	1	1	2	2
92	N	311	Bili	12955	4	4329	M	A	1	1	1	1	1	2
93	N	313	Bethoven	12961	4	719	M	J	1	1	1	1	1	1
94	N	324	Fia	10649	3	887	F	A	1	1	1	1	1	1
95	N	337	Dudu	13013	4	5391	F	A	1	1	1	1	1	1
96	N	375	Nina	13052	4	705	F	J	1	1	1	1	1	1
97	N	378	Faisca	13059	4	804	F	A	1	2	1	1	1	1
98	N	379	Max	13061	4	710	M	A	1	2	1	1	1	1
99	N	380	Tom	13020	4	5425	M	A	1	1	1	1	2	2
100	N	6	Lilica	12335	1	4295	F	A	1	2	-	-	-	-
101	N	20	Carrapicho	11795	1	4106	M	A	1	1	-	-	-	-
102	N	39	Moleque	12238	2	4306	M	A	1	1	-	-	-	-
103	N	51	Bela	12253	2	4313	F	J	1	1	-	-	-	-
104	N	61	Thoi (Troi)	12271	2	2864	M	J	1	1	1	1	-	-
105	N	76	Neguinho	12286	2	2708	M	A	1	1	-	-	-	-
106	N	83	Nina	10035	2	2723	F	A	1	1	-	-	-	-
107	N	117	Cristal	12430	2	806	F	J	1	1	2	2	-	-
108	N	128	Scooby	12553	3	809	M	J	1	1	1	1	-	-
109	N	133	Peludo	12658	3	1058	M	A	1	1	1	2	-	-
110	N	136	Tozan	12674	3	1053	M	J	1	1	2	2	-	-
111	N	176	Negão	12664	3	819	M	A	1	1	1	2	-	-
112	N	184	Neguinha	12690	3	815	F	J	1	1	1	1	-	-
113	N	185	Lobinho	12727	3	834	M	J	1	2	2	2	-	-
114	N	192	Fred	12812	3	750	M	A	1	1	1	1	-	-
115	N	197	Mel	12816	3	620	F	A	1	1	-	-	-	-
116	N	247	Susi	12847	3	670	F	A	1	1	2	2	-	-
117	N	251	Sansão	12854	3	729	M	J	1	1	1	1	-	-
118	N	260	Timão	12864	3	5393	M	A	1	2	1	2	-	-
119	N	292	Belinha	12902	3	5422	F	A	1	1	-	-	-	-
120	N	293	Mel	12916	3	697	F	J	1	1	2	1	-	-
121	N	297	Laica	12943	4	700	F	A	1	1	2	2	-	-
122	N	304	Bob	12927	4	872	M	J	1	1	-	-	-	-
123	N	308	Lilica	12923	4	888	F	A	1	1	-	-	-	-
124	N	315	Lessie	9232	4	891	F	A	1	1	-	-	-	-
125	N	316	Pandora	12968	4	666	F	A	1	2	1	CINZA	-	-
126	N	317	Julia	12907	3	701	F	J	1	1	-	-	-	-
127	N	326	Lupi	12976	4	5394	F	A	1	1	-	-	-	-
128	V1	11	Pingo	12215	1	4320	M	A	1	2	1	1	1	1
129	V1	28	Teca	12225	1	4127	F	J	1	1	1	1	1	1
130	V1	32	Laika	1735	2	4076	F	I	1	1	1	2	1	1

131	V1	41	Manta	12241	2	4112	M	A	1	1	1	1	1	1
132	V1	46	Doby	11755	2	4304	M	A	1	1	1	1	1	CINZA
133	V1	58	Cristal	12262	2	2861	F	J	1	1	2	1	2	1
134	V1	63	Meg	12274	2	2872	F	A	1	1	1	1	2	2
135	V1	65	Loren	8258	2	2859	F	A	1	1	1	1	1	1
136	V1	72	Zeus	12279	2	2865	M	A	1	1	1	1	1	1
137	V1	75	Bebel	9888	2	2728	F	A	1	1	1	1	1	1
138	V1	90	Jhuly	4070	2	2709	F	I	1	1	1	1	1	1
139	V1	93	Kira	8063	2	2718	F	A	1	1	1	2	1	1
140	V1	97	Meg	12415	2	797	F	A	1	1	1	1	1	2
141	V1	101	Laika	12417	2	0801	F	A	1	1	1	1	1	1
142	V1	132	Pitoco	12672	3	1079	M	A	1	1	1	2	2	1
143	V1	147	Max	12655	3	1072	M	A	1	1	1	2	2	2
144	V1	149	Neguinho	12694	3	0821	M	A	1	1	1	2	1	2
145	V1	154	Bidu	12736	3	0830	M	A	1	2	1	2	1	2
146	V1	156	Pantera	12716	3	0822	F	A	1	2	1	1	2	2
147	V1	163	Safira	10835	3	1052	F	A	1	1	1	1	1	1
148	V1	170	Tico	10771	3	0818	M	A	1	1	1	1	1	1
149	V1	172	Coca	7417	3	0824	F	A	1	2	1	2	1	1
150	V1	190	Neguinho	12815	3	0619	M	J	1	1	1	1	1	1
151	V1	194	Raoni	12822	3	0749	M	A	1	1	1	CINZA	2	1
152	V1	206	Chulica	12782	3	0629	F	A	1	1	1	2	1	1
153	V1	222	Jhuly	12762	3	0726	F	J	1	1	1	2	1	1
154	V1	229	Mileid	10671	3	0630	F	A	1	1	1	2	1	2
155	V1	231	Mel	12803	3	0626	F	J	1	1	1	1	1	1
156	V1	234	Rati	10659	3	0687	M	A	1	1	1	1	1	1
157	V1	250	Xuxa	12855	3	0734	F	J	1	1	1	1	1	1
158	V1	255	Bob	9065	3	0681	M	A	1	1	1	2	1	1
159	V1	259	Chocolate	10625	3	5387	M	A	1	1	1	1	1	1
160	V1	265	Chitara	12837	3	0675	F	J	1	1	1	1	1	1
161	V1	279	Pitica	12891	3	0664	F	J	1	1	1	1	1	1
162	V1	282	Pipoca	12890	3	0712	F	J	1	1	1	1	1	1
163	V1	284	Fumaça	12887	3	5398	F	A	1	1	1	1	1	1
164	V1	296	Titico	12960	4	0689	M	A	1	1	1	1	1	1
165	V1	318	Tiffany	12908	3	5395	F	A	1	1	1	2	1	2
166	V1	319	Manuela	12906	3	0668	F	J	1	1	1	1	1	1
167	V1	331	Jagunço	12989	4	5400	M	A	1	2	1	1	1	1
168	V1	341	Bek	13008	4	0691	F	A	1	2	2	2	2	2
169	V1	346	Piti	4274	4	0890	F	A	1	1	1	1	1	1
170	V1	348	Bili	13062	4	0870	M	J	2	1	1	2	1	1
171	V1	362	Sandy	7689	4	0778	F	A	1	1	1	1	1	1
172	V1	369	Chico	10466	4	0857	M	A	2	2	2	1	2	2
173	V1	370	Igor	13018	4	767	M	J	1	1	2	1	2	1
174	V1	376	Lili	13053	4	0720	F	A	1	1	1	1	1	1
175	V1	381	Luna	13019	4	0696	F	A	1	1	1	1	1	1
176	V1	3	Menina	10433	1	4051	F	I	1	1	-	-	-	-

177	V1	14	Xulinha	11790	1	4089	F	A	1	1	-	-	-	-
178	V1	81	Matraca	12376	2	2729	F	A	1	1	-	-	-	-
179	V1	99	Bethoven	12412	2	2703	M	A	1	2	-	-	-	-
180	V1	100	Neguinha	12413	2	2715	F	A	1	2	-	-	-	-
181	V1	107	Branquinha	12421	2	794	F	A	1	1	-	-	-	-
182	V1	116	Polly	12433	2	0787	F	J	1	1	2	2	-	-
183	V1	123	Valente	12448	2	0799	M	A	1	2	2	2	-	-
184	V1	157	Piti	12712	3	0829	M	A	1	2	1	1	-	-
185	V1	193	Bela	12810	3	742	F	A	1	2	-	-	-	-
186	V1	200	Kira	12799	3	0624	F	A	1	1	1	1	-	-
187	V1	220	Jhuly	9116	3	0722	F	A	1	2	-	-	-	-
188	V1	228	Mel	12757	3	0622	F	J	1	1	-	-	-	-
189	V1	258	Pety	12876	3	5421	M	A	1	1	-	-	-	-
190	V1	305	Luma	12938	4	899	F	J	1	1	-	-	-	-
191	V1	310	Bethoven	12956	4	2289	M	A	1	CINZA	1	1	-	-
192	V1	334	Bob	12947	4	875	M	J	1	2	-	-	-	-
193	V1	338	Negão	12965	4	5399	M	A	1	2	2	2	-	-
194	V1	368	Negão	13064	4	0854	M	J	1	2	2	2	-	-
195	V1	374	Bob	13050	4	0855	M	A	1	2	1	CINZA	-	-
196	V1C	5	Surubim	12333	1	4055	M	A	1	2	1	2	1	CINZA
197	V1C	10	Esponja	12214	1	4312	M	J	1	1	1	1	1	1
198	V1C	15	Sleep	9608	1	4300	M	A	1	1	1	1	1	1
199	V1C	19	Lupita	12218	1	4104	F	A	1	1	2	1	2	2
200	V1C	26	Nike	12220	1	4088	M	A	1	1	1	1	1	1
201	V1C	27	July	12226	1	4111	F	A	1	1	1	1	1	1
202	V1C	36	Bilo	12236	2	4303	M	A	1	1	1	1	1	1
203	V1C	42	Nina	12242	2	4126	F	J	1	1	1	2	1	1
204	V1C	48	Luna	12249	2	4319	F	A	1	1	1	1	1	1
205	V1C	50	Meg	12254	2	2856	F	A	1	1	1	2	1	1
206	V1C	54	Safira	9868	2	2862	F	A	1	2	1	2	1	2
207	V1C	67	Totó	12276	2	2857	M	A	1	1	1	1	1	1
208	V1C	68	Zeus	8014	2	2873	M	I	1	1	1	1	1	1
209	V1C	79	Mel	12285	2	2716	F	A	1	2	1	2	2	CINZA
210	V1C	85	Bred	2214	2	2717	M	A	1	1	1	1	1	1
211	V1C	91	Hane	4482	2	2726	F	I	1	1	1	1	1	1
212	V1C	95	Mel	12385	2	2730	F	A	1	1	2	2	2	CINZA
213	V1C	114	Mel	12429	2	0786	F	A	1	1	1	1	1	1
214	V1C	121	Pretinha	12444	2	0788	F	A	1	1	1	1	1	1
215	V1C	129	Spike	12646	3	1078	M	A	1	2	1	1	1	1
216	V1C	130	Melissa	12576	3	1066	F	A	1	2	1	1	1	2
217	V1C	131	Bolota	12659	3	1073	M	A	1	2	1	1	1	1
218	V1C	151	Lili	12721	3	1064	F	A	1	2	1	1	1	1
219	V1C	167	Kiara	12625	3	1060	F	A	1	1	1	1	1	1
220	V1C	177	Max	12724	3	0836	M	A	1	1	1	1	1	1
221	V1C	189	Joli	12800	3	0614	M	J	1	1	1	2	1	1
222	V1C	202	Bolt	12808	3	0616	M	J	1	1	1	1	1	1

223	V1C	204	Dodo	7510	3	0738	M	A	1	1	1	2	1	1
224	V1C	216	Sofia	12823	3	0604	F	A	1	2	1	1	1	2
225	V1C	224	Leão	12761	3	0721	M	J	1	1	1	1	1	1
226	V1C	227	Bug	12776	3	0613	M	A	1	1	1	1	1	1
227	V1C	230	Snepi	12779	3	0605	M	J	1	1	1	2	1	1
228	V1C	239	Rex	9100	3	0724	M	A	1	1	1	1	1	1
229	V1C	254	Max	12871	3	0688	M	A	1	2	1	1	1	2
230	V1C	271	Rusti	12868	3	0714	M	A	1	1	1	1	1	1
231	V1C	280	Bidu	12893	3	0663	M	A	1	1	1	2	1	2
232	V1C	285	Pitucha	12888	3	0715	F	A	1	1	1	1	1	1
233	V1C	290	Bili	7530	3	0883	M	A	1	1	1	1	1	1
234	V1C	306	Pitucha	4432	4	5396	F	A	1	1	1	1	1	1
235	V1C	314	Nina	12963	4	0876	F	A	1	2	1	1	1	1
236	V1C	323	Baboo	12905	3	0678	M	A	1	1	1	1	1	1
237	V1C	329	Branquinha	12991	4	0694	F	I	1	1	1	1	1	1
238	V1C	336	Malu	12983	4	0672	F	A	1	1	1	2	1	1
239	V1C	339	Pandora	13003	4	0885	F	A	1	1	1	1	1	1
240	V1C	343	Bolinha	9137	4	0895	F	A	1	1	1	2	1	1
241	V1C	355	Chaiene	13041	4	0754	F	J	1	1	1	1	1	1
242	V1C	373	Bethoven	13047	4	0864	M	A	1	1	1	2	1	1
243	V1C	113	Laika	12428	2	784	F	A	1	1	-	-	-	-
244	V1C	125	Mel	12558	3	0791	F	A	2	1	2	2	-	-
245	V1C	158	Chaila	12711	3	828	F	A	1	1	-	-	-	-
246	V1C	168	Babaloo	12643	3	0816	F	J	1	2	1	1	-	-
247	V1C	174	Xuxa	12708	3	1071	F	A	1	1	-	-	-	-
248	V1C	181	Dominique	12695	3	837	M	J	1	1	-	-	-	-
249	V1C	183	Piti	12687	3	832	F	A	1	1	-	-	-	-
250	V1C	191	Titiu	10641	3	748	F	A	1	1	-	-	-	-
251	V1C	235	Fáisca	12833	3	679	F	A	1	1	-	-	-	-
252	V1C	248	Estrelinha	12848	3	665	F	A	1	1	-	-	-	-
253	V1C	268	Moleque	12885	3	706	M	J	1	1	-	-	-	-
254	V1C	294	Batata	12911	3	5392	M	J	1	1	-	-	-	-
255	V1C	332	Luma	12952	4	0889	F	A	1	2	1	1	-	-
256	V1C	366	Guaxinin	13058	4	867	M	A	1	1	-	-	-	-
257	V2	7	Diana	5711	1	4298	F	A	1	1	1	1	1	1
258	V2	16	Neguinha	12339	1	4309	F	A	1	1	1	1	1	1
259	V2	18	Mel	12210	1	4296	F	J	1	1	1	1	1	1
260	V2	29	Mel	12224	1	4113	F	J	1	1	1	1	1	1
261	V2	31	Arin	8006	1	4062	F	A	1	1	1	2	1	1
262	V2	34	Nina	2717	2	4294	F	I	1	1	1	1	1	1
263	V2	35	Malhada	9825	2	4305	F	A	1	1	1	1	1	2
264	V2	38	Mel	12237	2	4080	F	A	1	2	1	1	1	1
265	V2	47	Mili	12248	2	4318	F	A	1	1	1	1	1	1
266	V2	52	Lessie	9866	2	2858	F	A	1	2	1	1	1	1
267	V2	55	Duque	12258	2	2853	M	A	1	1	1	1	1	1
268	V2	73	Tufão	12280	2	2879	M	J	1	1	2	1	2	1

269	V2	74	Piti	12282	2	2704	M	A	1	1	1	2	1	1
270	V2	82	Bili	12377	2	2725	M	A	1	1	1	1	1	1
271	V2	87	Pitoco	12383	2	2714	M	A	1	1	2	2	2	2
272	V2	98	Lili	12416	2	0795	F	A	1	1	2	1	2	2
273	V2	102	Luana	12418	2	2702	F	J	1	1	1	1	1	1
274	V2	103	Clifort	12419	2	0804	M	J	1	1	1	1	1	1
275	V2	115	Princesa	10420	2	0781	F	A	1	1	1	1	1	1
276	V2	120	Safira	12443	2	0803	F	J	1	1	1	1	1	1
277	V2	124	Bill	12449	2	0782	M	J	1	1	1	1	1	1
278	V2	139	Faisca	12577	3	1069	M	A	1	1	2	2	2	2
279	V2	144	Fubá	11688	2	1061	M	A	1	1	1	1	1	2
280	V2	145	Scooby	12685	3	1065	M	A	1	1	1	1	1	1
281	V2	159	Pepe	12714	3	0611	F	A	1	1	1	1	2	1
282	V2	162	Bob	12565	3	0820	M	A	1	1	1	1	1	1
283	V2	178	Aquiles	12629	3	0831	M	A	1	1	2	1	1	1
284	V2	179	Keity	12562	3	0840	F	A	1	1	1	1	1	1
285	V2	195	Alice	12820	3	0823	F	A	1	1	1	1	1	1
286	V2	196	Babu	12817	3	0835	M	A	1	2	1	1	1	1
287	V2	208	Barrozinho	12794	3	0618	M	A	1	1	1	1	1	1
288	V2	217	Joy	12814	3	0602	M	A	1	1	1	1	1	1
289	V2	242	Nina	12852	3	0735	F	A	1	1	1	1	1	1
290	V2	266	Punk	12839	3	716	M	J	1	1	1	1	2	2
291	V2	267	Scort	12845	3	0625	M	J	1	1	1	1	1	1
292	V2	276	Lassie	10647	3	0873	F	A	1	1	1	2	1	1
293	V2	278	Ximbica	12892	3	0673	F	A	1	1	1	1	1	1
294	V2	289	Mel	12914	3	0713	F	J	1	1	1	1	1	1
295	V2	295	Tufão	12912	3	0667	M	J	1	2	1	1	1	1
296	V2	312	Nino	12962	4	5388	M	J	1	1	1	1	1	1
297	V2	321	Joli	10727	3	0708	F	J	1	1	2	1	1	1
298	V2	325	Fred	12966	4	0894	M	A	1	1	1	1	1	1
299	V2	344	Brisa	13011	4	0695	F	A	1	1	1	CINZA	1	1
300	V2	345	Pingo	13015	4	5423	M	A	1	2	2	1	1	1
301	V2	351	Nina	13026	4	0757	F	A	1	1	1	1	1	1
302	V2	354	Nene	13031	4	0772	M	A	1	2	1	1	1	1
303	V2	356	Joio	13036	4	0773	M	A	1	2	1	1	1	1
304	V2	358	Sasha	13039	4	0843	F	A	1	1	1	2	1	1
305	V2	359	Neguinha	13063	4	0858	F	A	1	2	1	1	1	1
306	V2	361	Tigrão	13028	4	0842	M	A	1	1	1	2	1	1
307	V2	372	Boris	13048	4	0841	M	A	2	2	1	2	1	2
308	V2	377	Bob	13051	4	0698	M	A	1	1	1	1	1	1
309	V2	12	Dieizon	11796	1	4091	M	A	1	2	2	2	-	-
310	V2	59	Lessie	9879	2	2863	F	A	1	1	2	2	-	-
311	V2	108	Rex	12422	2	802	M	A	1	1	-	-	-	-
312	V2	135	Bela	12660	3	11075	F	A	1	1	1	1	-	-
313	V2	146	Cherry	12649	3	1055	F	J	1	2	2	2	-	-
314	V2	150	Penelope	10761	3	827	F	I	1	1	-	-	-	-

315	V2	213	Rossi	12806	3	0609	M	A	1	1	1	1	-	-
316	V2	223	Tiquinho	12763	3	725	M	A	1	1	-	-	-	-
317	V2	238	Chiquinha	12835	3	0662	F	A	1	2	1	2	-	-
318	V2	256	Bili	12866	3	878	M	J	1	1	-	-	-	-
319	V2	301	Lilica	12937	4	5424	F	A	1	2	-	-	-	-
320	V2	327	Javaninha	12975	4	879	F	J	1	1	-	-	-	-
321	V2	349	Lilica	13042	4	0766	F	A	1	2	1	1	-	-
322	V2	367	Nina	9173	4	0774	F	A	1	1	1	1	-	-
323	V2C	4	Pandora	12330	1	4065	F	A	1	2	1	2	1	1
324	V2C	9	Jack	12212	1	4063	M	J	1	CINZA	1	1	1	1
325	V2C	45	Mailon	9846	2	4293	M	A	1	1	1	1	1	1
326	V2C	56	Fred	1259	2	2854	M	A	2	1	1	1	2	1
327	V2C	60	Beethoven	12267	2	2871	M	A	1	1	1	1	1	2
328	V2C	64	Pandora	9892	2	2705	F	A	1	1	1	1	1	1
329	V2C	66	Borboletinha	12265	2	2874	F	A	1	1	1	1	1	1
330	V2C	71	Nina	2158	2	2724	F	I	1	1	1	1	1	1
331	V2C	78	Linda	12284	2	2706	F	J	1	1	1	1	1	1
332	V2C	88	Cheri	12382	2	2720	F	J	1	1	2	2	2	2
333	V2C	92	Nina	3012	2	2722	F	A	1	2	1	1	2	1
334	V2C	110	Keiti	12424	2	0800	F	A	1	2	1	2	1	2
335	V2C	112	Lana	12426	2	0805	F	A	1	1	1	1	1	1
336	V2C	137	Kidy	12560	3	1059	M	A	1	1	1	2	1	1
337	V2C	140	Boby	12663	3	1076	M	A	1	1	2	1	1	1
338	V2C	141	Brutus	10706	3	1077	M	A	1	1	1	1	1	1
339	V2C	148	Mel	12691	3	0812	F	A	1	1	1	2	1	1
340	V2C	153	Mel	12718	3	1070	F	J	1	1	1	2	2	2
341	V2C	165	Rex	12624	3	1063	M	J	1	1	2	2	2	2
342	V2C	180	Bili	12732	3	0838	M	A	1	1	1	1	1	1
343	V2C	186	Duque	12796	3	0744	M	A	1	1	1	1	1	1
344	V2C	201	Samira	12798	3	0736	F	J	1	1	1	1	1	1
345	V2C	207	Laica	12787	3	0621	F	A	1	2	1	1	1	1
346	V2C	214	Pantera	9023	3	607	F	A	1	1	1	1	1	1
347	V2C	225	Chocolate	12759	3	0740	M	A	2	1	1	1	1	2
348	V2C	232	Bolinha	12784	3	0730	F	A	1	1	1	1	1	1
349	V2C	237	Rubi	12836	3	0661	F	A	1	2	1	1	1	2
350	V2C	240	Poli	9101	3	0745	F	A	1	1	1	1	1	1
351	V2C	243	Neguinha	12828	3	0731	F	A	1	1	1	1	2	1
352	V2C	253	Luna	12873	3	0669	F	A	1	1	1	1	1	1
353	V2C	269	Laila	12861	3	0693	F	A	1	1	1	1	1	1
354	V2C	270	Doc	12869	3	5389	M	J	1	2	1	1	1	1
355	V2C	272	Patata	12886	3	882	M	J	1	1	1	1	1	1
356	V2C	286	Xuxa	12909	3	677	F	J	1	1	1	2	2	2
357	V2C	299	Daiene	12958	4	884	F	A	1	1	1	1	1	1
358	V2C	303	Faisca	10521	4	893	M	A	1	1	1	2	1	1
359	V2C	307	Serena	10843	4	880	F	A	1	2	1	1	1	1
360	V2C	322	Didiu	8848	3	676	M	A	1	1	1	1	1	1

361	V2C	335	Belinha	12950	4	699	F	A	1	1	2	2	2	2
362	V2C	342	Belinha	13012	4	898	F	J	1	1	1	1	1	1
363	V2C	347	Tobi	12981	4	892	M	A	1	2	1	1	1	1
364	V2C	352	Belinha	13032	4	768	F	A	1	1	1	1	2	2
365	V2C	365	Pinti	13060	4	866	F	A	1	1	1	1	1	1
366	V2C	371	Cloi	13054	4	853	F	A	1	1	1	1	1	1
367	V2C	13	Bradock	11793	1	4102	M	A	1	1	-	-	-	-
368	V2C	25	Belinha	12221	1	4090	F	A	1	1	2	2	2	2
369	V2C	40	Lilica	12239	2	4124	F	A	1	2	-	-	-	-
370	V2C	105	Chiquinho	10151	2	792	M	A	1	1	-	-	-	-
371	V2C	118	Mel	12435	2	0807	F	A	1	1	-	-	-	-
372	V2C	127	Nina	12554	3	796	F	J	1	1	-	-	-	-
373	V2C	138	Lessie	12686	3	1080	F	A	1	1	1	2	-	-
374	V2C	188	Lessie	12801	3	0746	F	A	1	2	-	-	-	-
375	V2C	226	Mel	12775	3	0747	F	A	1	1	-	-	-	-
376	V2C	246	Poli	12853	3	0727	F	A	1	1	1	1	-	-
377	V2C	249	Ketelen	12846	3	0682	F	A	1	1	-	-	-	-
378	V2C	257	Chuck	12877	3	0717	M	A	1	2	-	-	-	-
379	V2C	281	Bidu	2978	3	671	M	I	1	2	-	-	-	-
380	V2C	302	Sarita	12930	4	718	F	A	1	1	2	2	-	-
381	V2C	328	Javanessa	12974	4	896	F	J	1	1	-	-	-	-

Fonte: (LOPES, E. G., 2015) Coortes: (N) coorte de animais controle; (C) coorte de animais com a coleira Scalibor®; (V1) coorte de animais vacinados com Leishmune®; (V1C) coorte de animais vacinados com Leishmune® + coleira Scalibor®; (V2) coorte de animais vacinados com Leish-Tec®; (V2C) coorte de animais vacinados com Leish-Tec® + coleira Scalibor®; RA: registro do animal no município; CHIP: número do CHIP implantado no animal; Sexo: (F) fêmeas/ (M) machos; Idade: (J) jovens = até 1 ano; (A) adultos = de 1 a 8 anos de idade; (I) idosos = mais de 8 anos de idade; Tempo Zero (em azul): Resultados de TR-DPP® e EIE-ELISA® (1) negativo/ (2) positivo; Tempo 1 (em amarelo): Resultados de TR-DPP® e EIE-ELISA® (1) negativo/ (2) positivo após 6 meses do tempo zero; Tempo 2 (em roxo): Resultados de TR-DPP® e EIE-ELISA® (1) negativo/ (2) positivo após 12 meses do tempo zero. Cinza: animais com resultado dentro da zona cinza do teste EIE-ELISA®; As caselas grafadas com (-) são eventos que não foram realizados.